

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JAQUELINE VOLPE

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES IMPEDIMÉTRICOS DESCARTÁVEIS
BASEADOS EM POLÍMEROS CONDUTORES E AuNPs PARA O
IMUNODIAGNÓSTICO DA COVID-19

CURITIBA

2021

JAQUELINE VOLPE

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES IMPEDIMÉTRICOS DESCARTÁVEIS
BASEADOS EM POLÍMEROS CONDUTORES E AuNPs PARA O
IMUNODIAGNÓSTICO DA COVID-19

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Dênio E. P. Souto

CURITIBA
2021

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

V931d Volpe, Jaqueline

Desenvolvimento de biossensores impedimétricos descartáveis baseados em polímeros condutores e AuNPs para o imunodiagnóstico da COVID-19 [Recurso eletrônico] / Jaqueline Volpe. – Curitiba, 2021.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2021.

Orientador: Dênio E. P. Souto.

1. Testes imunológicos. 2. Polímeros condutores. 3. Eletrodos. 4. Nanopartículas. I. Universidade Federal do Paraná. II. Souto, Dênio E. P. III. Título.

CDD: 540

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JAQUELINE VOLPE** intitulada: **Desenvolvimento de biossensores impedimétricos descartáveis baseados em polímeros condutores e AuNPs para o imunodiagnóstico da COVID-19**, sob orientação do Prof. Dr. DÊNIO EMANUEL PIRES SOUTO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Agosto de 2021.

DÊNIO EMANUEL PIRES SOUTO
Presidente da Banca Examinadora

MÁRCIO FERNANDO BERGAMINI
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

FLÁVIO SANTOS DAMOS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os professores e profissionais da UFPR, em especial aos membros do PPGQ pelos ensinamentos adquiridos nesse período de minha vida. Em especial, primeiramente, não poderia deixar de agradecer o meu orientador Prof. Dr. Dênio Souto, que desde o início não mediu esforços para me dar oportunidades de crescimento. Muito obrigada por toda a sua paciência, confiança e empatia.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcio Vidotti, que foi essencial nessa jornada, oferecendo generosamente sua estrutura ao longo dos experimentos desse trabalho, obrigada por todas as contribuições ao meu trabalho. Ao Prof. Dr. Herbert Winnischoffer pelas análises do infravermelho e empréstimo do potenciostato por boa parte do meu mestrado. Ao Prof. Dr. Marcio Bergamini, muito obrigada pelas importantes contribuições no exame de qualificação e pelo aceite em avaliar essa dissertação. Ao Prof. Dr. Luciano Huergo agradeço pelas amostras gentilmente concedidas. As Profa. Dra. Clarice Amaral e Profa. Dra. Noemi Nagata, por todo o carinho e ensinamentos tão essenciais nessa minha jornada. Agradeço também ao Prof. Dr. Flávio Santos Damos por aceitar participar no processo de avaliação dessa dissertação.

Queria também agradecer aos amigos adquiridos nessa jornada científica, que confesso não ter sido fácil, e sem vocês, muito provavelmente não teria conseguido. Aos amigos do LaESB, obrigada pela energia boa, companheirismo, amizade, além é claro dos “doces”, risadas, aventuras em busca de ratos, atrapalhadas, e não posso esquecer, é claro, dos conselhos e ensinamentos. Em especial para Luana, Adriano e Floriatan, obrigada “seus quiçaça”. Não poderia deixar de agradecer também aos membros do GPMIn e GCC, que enquanto eu era solitária na caminhada, me agregaram de maneira muito carinhosa. Gostaria de agradecer especialmente a Ana Leticia Soares, por todos os seus ensinamentos, amizade e boa energia, que em determinados momentos foram essenciais para que eu não desistisse. Ao Andrei, parceiro desde o início da jornada experimental, pela amizade, sinceridade e discussões científicas. A Bruna, parceira importantíssima nessa reta final, não tenho palavras suficientes para agradecer sua paciência e humildade, além da amizade. Muito obrigada também pela ajuda nas medidas de FTIR.

Porém, nada disso teria sido possível sem o apoio da minha base, daqueles que estão comigo desde o dia que eu nasci, e que me deram forças, às vezes até mesmo empurrões para que eu não desistisse. Primeiramente a minha mamis, Marlene, que sempre me apoiou e não mediu esforços para que eu acreditasse em mim, e ao meu Papi, Antônio Carlos, por toda a sua rigidez no ensino de matemática, além é claro, de todo o amor e carinho que sempre recebi. Espero que todo o esforço dos dois, ao longo das nossas vidas, esteja sendo recompensado, pelo menos um pouco, nesse meu trabalho.

Não poderia faltar um agradecimento às minhas irmãs, Janaina e Jéssica, que sempre estiveram ao meu lado, e além de tudo, me deram um “empurrãozinho” para eu seguir na carreira de exatas. Amo vocês incondicionalmente, muito obrigada por tudo. Aos meus sobrinhos, João, Luisa, Francisco e Luiz Antônio, que nos enchem de alegria todos os dias, nos lembrando de como é ser criança. Meu amor por vocês é incondicional! E aos meus cunhados, praticamente irmãos, Luis Paulo e Luiz Carlos, que por culpa deles, sempre me pressionam para me casar com um “Luis”, obrigada pela parceria, e principalmente, por serem parceiros e pais tão incríveis para as pessoas que eu mais amo.

Finalmente, existe a nossa família de sangue, e aquela família que a gente escolhe, nossos amigos. Nesse caso a lista é grande, pois tive uma vida muito abençoada nesse sentido. Espero não deixar passar ninguém. Primeiramente, não posso deixar de agradecer ao Caique, amigo lindo, que me ajudou a entender tudo que eu estava passando durante esses anos de mestrado. Amo você, sem você não teria chegado aqui. As minhas amigas Fernanda, Rafaela, Sabrina e Nathalia (prim) pela parceria e amizade por todos esses anos, já marcada, literalmente, em nossa pele, vocês foram meu refúgio em muitos momentos, obrigada. Aos meus amigos da vida, Thayline, Caroline, Gabriel, André, Eric, Iorhana, Tassiane, e aos meus primos, Carlos, Ane, Andressa, Leandra, Fabrício, Thiago e Ana Paula, por todas as risadas e conselhos adquiridos ao longo da vida. Sem vocês, minha vida seria tão sem graça! Por fim, agradeço aos meus amigos da Xavier University, que foram fundamentais para a minha escolha de realizar o meu mestrado: Rose, Thiago, Luke, Rennan, Hyan, Mauricio, Marcela e Gabriel.

Agradeço também à CAPES pela bolsa concedida e a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho. Se esqueci de alguém, me perdoe, nossa cabeça fica meio prejudicada nessa etapa do trabalho!

“O que nós sabemos tem importância, mas quem nós somos importa muito mais”
(BRENÉ BROWN, 2012).

RESUMO

A pandemia da COVID-19 (doença do coronavírus 2019) evidenciou a urgência no desenvolvimento de novos testes de diagnóstico confiáveis, de rápida resposta e baixo custo, evitando resultados falsos positivos e negativos e possibilitando testagem em alta escala. Biossensores apresentam-se como boas alternativas para tal problemática, uma vez que demonstram boa sensibilidade, seletividade e capacidade de portabilidade. No presente trabalho, foram desenvolvidos biossensores impedimétricos baseados em eletrodos modificados com polímeros condutores, decorados com nanopartículas metálicas, objetivando-se um material biocompatível, descartável e de relativa rápida resposta. Primeiramente, caracterizou-se a síntese eletroquímica dos polímeros poli (3,4-etilenodioxitiofeno - PEDOT) e polipirrol (PPy) sobre eletrodos de malha de aço, utilizando o poliestirenosulfonato de sódio (PSS) como dopante. Em seguida, nanopartículas de ouro (AuNPs) foram incorporadas a cada um dos eletrodos, etapa esta caracterizada através de técnicas eletroquímicas - (voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)) - e microscópicas, via microscopia eletrônica de varredura. Evidenciado o sucesso na síntese de ambas as plataformas (PEDOT:PSS-AuNPs e PPy:PSS-AuNPs), com o intuito de permitir uma ligação mais ordenada e, por conseguinte, maior funcionalidade do elemento de reconhecimento (bioreceptor), foi realizada a funcionalização das AuNPs a partir da formação de uma SAM (monocamada auto-organizada), formada pela ligação do ácido 3-mercaptopropiônico. Inicialmente, foi avaliada a utilização da plataforma PEDOT:PSS-AuNP para um sistema modelo, baseado na interação biotina/avidina, imobilizando covalentemente o anticorpo biotinilado anti-avidina, sendo possível detectar, via metodologia proposta, uma concentração de 5 pmol L^{-1} de avidina conjugada com a enzima *Horseradish peroxidase*. Demonstrada a construção do biossensor para o sistema modelo, por fim, foi realizada a ligação covalente da proteína N (proteína nucleocapsídica do novo coronavírus), sendo cada etapa envolvida no processo de construção do imunossensor caracterizada por técnicas eletroquímicas e espectroscópicas (espectroscopia na região do infravermelho). Foi possível demonstrar o sucesso da construção dos biossensores utilizando cada um dos materiais poliméricos como plataforma. Em termos comparativos, o eletrodo PPy:PSS apresentou melhor resposta analítica para a detecção de anticorpos da COVID-19 exibindo limites de detecção e quantificação de 19,1 e 58,3 pmol L^{-1} , respectivamente, e apresentando também variações significativas no parâmetro de R_{CT} quando exposta a diluições seriadas de soro positivo para COVID-19 (1:12800 – 1:400 / V:V), diferentemente do PEDOT:PSS. Desta maneira, foi possível a produção de um biossensor impedimétrico capaz de detectar baixas concentrações de anticorpos, dispositivo esse promissor para a aplicação como uma possível nova ferramenta de diagnóstico da infecção da COVID-19.

Palavras-chave: Imunossensor. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica. COVID-19. Polímero Condutor. Eletrodo Modificado.

ABSTRACT

COVID-19 (coronavirus disease 2019) pandemic has evidenced the urge on the development of new reliable low-cost diagnostic tests, which present fast responses, avoiding false positives and negatives results, allowing large-scale testing. Biosensors present as good alternatives for this problem, showing good sensibility, selectivity, and portability. In the current work, impedimetric biosensors based on conducting polymers modified electrodes, decorated with metallic nanoparticles, aiming a biocompatible, disposable, and fast response test alternative were developed. Firstly, the electrochemical synthesis of the polymers PEDOT and PPy – poly (3,4-ethylenedioxythiophene) and polypyrrole respectively – onto stainless steel mesh was characterized, both using polystyrene sulfonate (PSS) as a dopant. After, gold nanoparticles (AuNPs) were incorporated in each of the modified electrodes, being this step characterized by electrochemical techniques – cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) – as well as microscopic techniques (scanning electron microscope). It was possible to estimate the AuNP sizes of 14 nm through microscopic techniques. Once the success in both platform synthesis (PEDOT:PSS-AuNPs and PPy:PSS-AuNPs) was evidenced, and in order to allow a more ordered binding and, therefore, greater functionality of the recognition element (bioreceptor), the functionalization of the AuNPs was performed by a SAM (self-organized monolayer) formation, established by the binding of acid 3-mercaptopropionic acid. Initially, the utilization of the PEDOT:PSS-AuNP platform was evaluated to a model system based on the biotin/avidin interaction, covalently immobilizing a biotinylated antibody anti-avidin, being possible to detect through this system, via proposed methodology, avidin-HRP in the concentration of 5 pmol L⁻¹. Once the construction of the biotin/avidin biosensor was demonstrated, lastly, the covalent bonding of N protein onto the AuNPs surface, for both platforms, was accomplished, being each step related to the construction of the immunosensor characterized by electrochemical and spectroscopical techniques (infrared spectroscopy). It was possible to demonstrate the success in the construction of the COVID-19 immunosensors using each of the conducting polymer's platforms. In comparative terms, the PPy:PSS electrode presented a better analytical response for the detection of COVID-19 antibodies, exhibiting limits of detection and quantification of 19,1 and 58,3 pmol L⁻¹, respectively, and presenting significative variations of R_{CT} when exposed to serial dilutions of COVID-19 positive serums (trough 1:12800 to 1:400 / V:V), unlike PEDOT:PSS. Thus, it was possible to produce an impedimetric biosensor, capable of detecting low concentrations of antibodies of COVID-19, making this dispositive a promising tool for application in COVID-19 infection diagnosis.

Keywords: Immunosensor. Electrochemical Impedance Spectroscopy. COVID-19. Conducting Polymer. Modified Electrode.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DE UM BIOSSENSOR QUÍMICO CONSTITUÍDO POR UM RECEPTOR (QUE PODE SER COMPOSTO DE DIFERENTES BIOESTRUTURAS) QUE REAGE SELETIVAMENTE COM O ANALITO PRESENTE NA MATRIZ, E UM TRANSDUTOR QUE GERA SINAL POSSÍVEL DE SER ANALISADO E INTERPRETADO	13
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DE REAÇÃO DE ATIVAÇÃO DO ÁCIDO 3-MERCAPTOPROPIONICO SOBRE SUPERFÍCIE DO OURO COM EDC e NHS	15
FIGURA 3 – ILUSTRAÇÃO DO FUNCIONAMENTO DO SENSOR DE SPR ATRAVÉS DA CONFIGURAÇÃO DE KRETSCHEMANN.....	17
FIGURA 4 – EXEMPLO DE CÉLULA ELETROQUÍMICA CLÁSSICA DE TRÊS ELETRODOS (a) CONTRA-ELETRODO, (b) ELETRODO DE REFERÊNCIA, (c) ELETRODO DE TRABALHO (COMPOSTO DE POLÍMERO CONDUTOR), E OS RESPECTIVOS PROCESSOS INTERFACIAIS POSSÍVEIS DE SEREM CARACTERIZADOS SOBRE ELETRODO DE TRABALHO	19
FIGURA 5 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DO PEDOT E PPy	21
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DO NOVO CORONAVÍRUS E SUAS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS	24
FIGURA 7 – ESQUEMA GERAL (A) DAS ETAPAS DE SÍNTESE ELETROQUÍMICA DOS ELETRODOS DE PEDOT E PPy (ILUSTRADOS COMO POLÍMERO CONDUTOR) SOBRE A MALHA DE AÇO A105 E POSTERIOR INCORPORAÇÃO DE AuNPs E IMAGEM (B) DO ELETRODO FINAL SINTETIZADO PRÓXIMO A UM OBJETO REFERÊNCIA	30
FIGURA 8 – ESQUEMA DAS ETAPAS UTILIZADAS PARA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSENSOR: (i) FUNCIONALIZAÇÃO, (ii) ATIVAÇÃO, (iii) IMOBILIZAÇÃO, (iv) BLOQUEIO E (v) DETECÇÃO	31
FIGURA 9 – SENSORGRAMA ($\Delta\theta_{SPR}$ VS. TEMPO) OBTIDO PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA N SOBRE CHIP SENSOR DE SPR, FUNCIONALIZADO COM SAM DO ÁCIDO 11-MUA PREVIAMENTE ATIVADA VIA EDC/NHS.....	34
FIGURA 10 – SENSORGRAMA ($\Delta\theta_{SPR}$ VS. TEMPO DE REAÇÃO) EVIDENCIANDO OS PROCESSOS DE ASSOCIAÇÃO E DISSOCIAÇÃO APÓS ADIÇÃO DE DIFERENTES FATORES DE DILUIÇÃO (EM PBS) PARA (A) SORO POSITIVO E (B) SORO NEGATIVO PARA A COVID-19 ..	35

FIGURA 11 – (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS REALIZADOS EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,4), SOB VELOCIDADE DE VARREDURA 15 mV s ⁻¹ PARA PEDOT E PEDOT-AU. (B) DIAGRAMA DE NYQUIST DOS ELETRODOS MODIFICADOS COM PEDOT:PSS E PEDOT:PSS-AUNP OBTIDOS EM POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,4) E SEU CIRCUITO EQUIVALENTE CORRESPONDENTE	37
FIGURA 12 – IMAGENS REPRESENTATIVAS DE SEM PARA PEDOT:PSS-AuNP SINTETIZADOS EM MALHA DE AÇO POR (A) ESPALHAMENTO DE ELÉTRONS (SE) E (B) RETROESPALHAMENTO DE ELÉTRONS (BSE) E O RESPECTIVO ESPECTRO DE EDS.....	39
FIGURA 13 – IMAGEM DE SEM COM DISTRIBUIÇÃO ELEMENTAR DE (A) OURO, (B) CARBONO E (C) FERRO E (D) A SOBREPOSIÇÃO DOS 3 MAPEAMENTOS SOBRE IMAGEM DE SEM-SE	40
FIGURA 14 – (A) VOLTAMOGRAMAS REALIZADOS EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,4), SOB VELOCIDADE DE VARREDURA 20 mV s ⁻¹ PARA PEDOT:PSS-Au E PEDOT:PSS-AU-MPA E RESPECTIVOS (B) DIAGRAMA DE NYQUIST DOS ELETRODOS MODIFICADOS OBTIDOS EM POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,4).....	42
FIGURA 15 – DIAGRAMAS DE NYQUIST OBTIDOS EM POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,4) PARA CADA ETAPA NA CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR BASEADO NA INTERAÇÃO ENTRE AVIDINA E BIOTINA, ONDE AS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS DE BIOTINA E GLICINA FORAM DE 1 µmol L ⁻¹ e 100 mmol L ⁻¹ RESPECTIVAMENTE.....	44
FIGURA 16 – DIAGRAMAS DE NYQUIST OBTIDOS EM POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,4) PARA O ELETRODO MODIFICADO PEDOT:PSS-AuNP-MPA PARA AVALIAÇÃO DA ETAPA DE IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA N EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, (A) 1 µg mL ⁻¹ , (B) 10 µg mL ⁻¹ E (C) 100 µg mL ⁻¹ . (D)RELAÇÃO LINEAR OBSERVADA PARA A ETAPA DE ANCORAMENTO DA UNIDADE DE RECONHECIMENTO BIOLÓGICA FRENTE AO PARÂMETRO R _{CT}	46
FIGURA 17 – (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR PARA COVID-19, REALIZADOS EM SOLUÇÃO PBS EM VELOCIDADE DE VARREDURA 20 mV s ⁻¹ (B) DIAGRAMAS DE NYQUIST OBTIDOS DAS MESMAS ETAPAS EM POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,4). (C) MEDIDAS SUCESSIVAS DO BIOSSENSOR EM SOLUÇÃO PBS PARA AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE. (D) EXPOSIÇÃO DO BIOSSENSOR A DIFERENTES FATORES DE DILUIÇÃO DE SOROS CONVALESCENTES POSITIVOS PARA COVID-19.....	48

FIGURA 18 – (A) VOLTAMOGRAMAS REALIZADOS EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,4), SOB VELOCIDADE DE VARREDURA 20 mV s ⁻¹ PARA PPy:PSS E PPy:PSS-AU E RESPECTIVOS (B) DIAGRAMAS DE NYQUIST REALIZADOS EM POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,4) E SEU CIRCUITO EQUIVALENTE CORRESPONDENTE	51
FIGURA 19 – IMAGENS REPRESENTATIVAS DE SEM PARA PPy:PSS-AuNP POR (A) ESPALHAMENTO DE ELÉTRONS (SE) E (B) STEM COM DESTAQUE NAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PRESENTES NO MATERIAL	53
FIGURA 20 – ANÁLISE ELEMENTAR QUÍMICA PARA UMA FRAÇÃO DA MALHA DE AÇO MODIFICADA COM PPy:PSS-AuNP E SEU RESPECTIVO ESPECTRO DE EDS	54
FIGURA 21 – (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR PARA COVID-19 EM PPy:PSS-AuNP REALIZADOS EM SOLUÇÃO PBS E VELOCIDADE DE VARREDURA 20 mV s ⁻¹ . (B) DIAGRAMAS DE NYQUIST OBTIDOS EM POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,4) PARA AS MESMAS ETAPAS ANALISADAS POR CV E SEUS RESPECTIVOS (C) ESPECTROS DE FTIR	55
FIGURA 22 – (A) DIAGRAMAS DE NYQUIST OBTIDOS EM POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,4) DO ELETRODO PPy:PSS-AuNP-MPA-N-BSA PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ANTICORPO MONOCLONAL (mAb) E (B) RELAÇÃO LINEAR ENTRE ΔR_{CT} E AS CONCENTRAÇÕES DE mAb	58
FIGURA 23 – (A) DIAGRAMAS DE NYQUIST OBTIDOS EM POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,4) DO ELETRODO PPy:PSS-AuNP-MPA-N-BSA PARA DIFERENTES FATORES DE DILUIÇÃO DE SORO POSITIVO E (B) RELAÇÃO ENTRE ΔR_{CT} E AS CONCENTRAÇÕES DE Ab EM SORO POSITIVO PARA COVID-19	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS CALCULADOS A PARTIR DA MODELAGEM DOS DADOS DE EIS DO ELETRODO DE PEDOT:PSS ANTES E APÓS A ELETRODEPOSIÇÃO DAS AuNPs.....	38
TABELA 2 – PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS CALCULADOS A PARTIR DE DADOS DE EIS OBTIDOS EM CADA ETAPA ENVOLVIDA NA CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR PARA DETECÇÃO DA INTERAÇÃO AVIDINA-BIOTINA.....	44
TABELA 3 – PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS CALCULADOS A PARTIR DA MODELAGEM DOS DADOS DE EIS PARA COMPARAÇÃO DE RESPOSTA PARA AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO BIORECEPTOR	47
TABELA 4 – PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS CALCULADOS A PARTIR DA MODELAGEM DOS DADOS DE EIS PARA CADA ETAPA ENVOLVIDA NA CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR BASEADO EM PEDOT:PSS-AuNP PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA COVID-19	49
TABELA 5 – PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS CALCULADOS A PARTIR DA MODELAGEM DOS DADOS DE EIS DO ELETRODO DE PPy:PSS ANTES E APÓS A ELETRODEPOSIÇÃO DAS AuNPs.....	52
TABELA 6 – PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS CALCULADOS A PARTIR DA MODELAGEM DOS DADOS DE EIS PARA CADA ETAPA ENVOLVIDA NA CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR BASEADO EM PPy:PSS-AuNP PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA COVID-19	56
TABELA 7 – NÚMERO DE ONDA E SUAS RESPECTIVAS ATRIBUIÇÕES DAS BANDAS OBTIDAS POR FTIR PARA CARACTERIZAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DE BIOSENSOR IMPEDIMÉTRICO.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AC	Corrente alternada
AuNP	Nanopartículas de ouro
BSA	Albumina de soro bovino
BSE	Elétrons retroespalhados
COVID-19	Doença do novo coronavírus 2019
CV	Voltametria Cíclica
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida
EDOT	3,4-etilenodioxítiofeno
EDS	Espectroscopia de raios X por dispersão em energia
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GLY	Glicina
HPV	Papilomavírus humano
HRP	<i>Horseradish</i> peroxidase
IgG	Imunoglobulina G
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
mAb	Anticorpo monoclonal
MPA	Ácido 3-mercaptopropiônico
MUA	Ácido 11-mercaptoundecanóico
NHS	N-hidroxissuccinimida
WHO	Organização mundial da saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PC	Polímeros condutores
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEDOT	Poli (3,4-etilenodioxítiofeno)
PPy	Polipirrol
PSS	Poli(4-estirenosulfonato)
Py	Pirrol
Q _{dl}	Elemento de fase constante da dupla camada elétrica

Q_{lf}	Elemento de fase constante em baixas frequências
R_{CT}	Resistência a transferência de carga
RNA	Ácido ribonucleico
R_s	Resistência ôhmica
SAM	Monocamada auto-organizada
SARS-CoV-2	Síndrome respiratória aguda 2
SE	Elétrons espalhados
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
S_N2	Substituição nucleofílica bimolecular
SPR	Ressonância plasmônica de superfície
$\Delta\theta_{SPR}$	Variações no ângulo de SPR

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	ESTADO DA ARTE.....	13
2.1	BIOSSENSORES	13
2.2	RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE.....	16
2.3	ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA.....	17
2.4	POLÍMEROS CONDUTORES E ELETRODOS MODIFICADOS	20
2.5	COVID-19	22
3	OBJETIVOS	26
3.1	GERAL	26
3.2	ESPECÍFICOS.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	27
4.2	EQUIPAMENTOS.....	28
4.3	ELETROPOLIMERIZAÇÃO E INCORPORAÇÃO DE AUNP	29
4.4	CONSTRUÇÃO DOS BIOSSENSORES	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO DA COVID-19 POR SPR	33
5.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS MODIFICADOS DE PEDOT:PSS-AUNP	36
5.3	UTILIZAÇÃO DO PEDOT:PSS-AUNP PARA CONSTRUÇÃO DOS BIOSSENSORES	41
5.4	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS MODIFICADOS DE PPY:PSS-AUNP	50
5.5	UTILIZAÇÃO DO PPY:PSS-AUNP PARA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSOR PARA COVID-19.....	54
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
7	PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	62
	REFERÊNCIAS.....	63
	ANEXO A – DECLARAÇÕES ÉTICAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

Iniciada em 2019, em Wuhan, China, a doença do novo coronavírus (COVID-19, do inglês *Coronavirus disease*) rapidamente espalhou-se por todo o globo, causando um grande impacto na humanidade. Ela é causada pelo novo vírus chamado de coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) e apresenta como sintomas principais a febre, tosse, dificuldade de respiração, entre outros. Porém, muitos infectados permanecem assintomáticos, o que potencializa a contaminação silenciosa da doença (WHO, 2021). A identificação de indivíduos contaminados é essencial para o controle da infecção, possibilitando a determinação de melhores medidas de isolamento, entre outras considerações epidemiológicas, sendo observado que países que testaram extensivamente sua população, apresentaram taxas de mortalidade menores, quando comparado com países com distribuição similar de idade e recursos hospitalares (POKHREL; HU; MAO, 2020).

Atualmente, os testes mais comuns disponíveis são os imunocromatográficos de fluxo lateral, quimioluminescentes, imunoenzimáticos, e o da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*), sendo este último considerado o padrão ouro pela Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*). Porém, ainda se vê necessário testes que apresentem agilidade em sua resposta, facilidade de amostragem, mobilidade, sensibilidade e seletividade, minimizando assim respostas falso-negativas ou falso-positivas e melhorando sua acessibilidade. Biossensores, a partir das problemáticas anteriormente reportadas, apresentam-se como uma ferramenta que possivelmente facilitaria o diagnóstico da COVID-19 (RAVI et al., 2020).

Biossensores são uma classe de sensores que utilizam especificamente como unidades de reconhecimento componentes biológicos, como enzimas, células, tecidos, antígenos e anticorpos. Tal componente realiza o reconhecimento da substância investigada através de interações químicas que geram sinais proporcionais às concentrações do analito interpretadas pelo transdutor (HULANICKI; GLAB; INGMAN, 1991). Os sensores podem também ser subclassificados de acordo com o seu princípio de transdução, como por exemplo sensores óticos e eletroquímicos (HULANICKI; GLAB; INGMAN, 1991).

Biossensores eletroquímicos, baseados em mudanças de parâmetros eletroquímicos do sistema apresentam diversas vantagens quando comparados a outras técnicas, uma vez que permitem a construção de dispositivos miniaturizados de relativo baixo custo, além de serem de fácil aplicação. Dentro das técnicas eletroquímicas, a espectroscopia de impedância eletroquímica oferece uma das maiores sensibilidades, além de fornecer importantes informações interfaciais e superficiais (UYGUN; ERTUĞRUL UYGUN, 2014).

Para reduzir o tempo de resposta dos biossensores eletroquímicos, aumentar sua estabilidade e sensibilidade, e até mesmo confeccionar dispositivos descartáveis, miniaturizados e de baixo custo, a modificação de eletrodos com materiais poliméricos tem sido frequentemente utilizada (JANÁKY; VISY, 2013). Polímeros condutores como o poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT) e polipirrol (PPy, do inglês *polypyrrole*) apresentam diversas vantagens, como simplicidade no preparo, estabilidade eletroquímica, capacidade de carga e condutividade, além de eletroatividade em solução tampão fosfato salino pH 7,4, bastante utilizado para análise em biossensores, dispensando a utilização de uma sonda eletroquímica. Quando associado às nanopartículas metálicas podem apresentar melhor desempenho devido a efeitos sinérgicos entre os materiais, o que melhora a performance dos sensores (DE OLIVEIRA ET AL., 2015; MOON ET AL., 2018). Um dos materiais mais utilizados para esta finalidade é o ouro, por conta de sua biocompatibilidade, alta condutividade, estabilidade e baixa toxicidade, além de possível funcionalização de sua superfície para uma imobilização covalente do bioreceptor, oferecendo uma orientação mais controlada para o mesmo (SAHA et al., 2012).

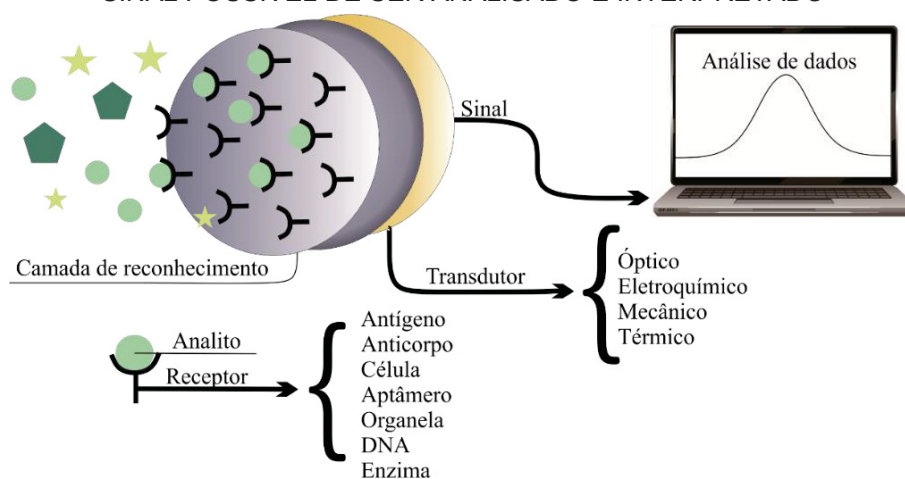
Diante o exposto, o presente trabalho é focado no uso da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica para desenvolvimento de biossensores como novas metodologias de diagnóstico para a doença do novo coronavírus (COVID-19). A partir dos biossensores eletroquímicos foi possível construir uma plataforma de baixo custo empregando eletrodos descartáveis funcionalizados com um material híbrido formado pelos polímeros PEDOT e PPy decorados com nanopartículas de ouro.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 BIOSSENSORES

Segundo a IUPAC, sensores químicos correspondem a dispositivos que respondem seletivamente a compostos ou espécies químicas presentes numa matriz, onde o sinal originado de uma reação química ou uma propriedade física do sistema é proporcional a sua concentração. Apresentam como principais benefícios a seletividade, versatilidade de aplicação e possibilidade de miniaturização (METKAR; GIRIGOSWAMI, 2019). Detêm basicamente duas unidades funcionais, um receptor e um transdutor, em que o primeiro transforma a informação química seletiva em relação a um analito em forma de energia compatível com o transdutor, que transformará esse sinal da amostra em sinal analítico útil (HULANICKI; GLAB; INGMAN, 1991). Um dos fatores mais importantes para a qualidade desses sensores baseiam-se na força de interação entre o elemento de reconhecimento e o analito, sendo de interesse que a mesma ocorra de maneira seletiva (FARIA et al., 2015). No caso dos biossensores, os receptores são elementos biológicos, como organismos, tecidos, células, organelas, enzimas, anticorpos, etc., que gerarão sinal analítico a partir de interações biomoleculares (HULANICKI; GLAB; INGMAN, 1991). Na FIGURA 1 é possível observar um esquema geral de funcionamento de um biossensor.

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DE UM BIOSSENSOR QUÍMICO CONSTITUÍDO POR UM RECEPTOR (QUE PODE SER COMPOSTO DE DIFERENTES BIOESTRUTURAS) QUE REAGE SELETIVAMENTE COM O ANALITO PRESENTE NA MATRIZ, E UM TRANSDUTOR QUE GERA SINAL POSSÍVEL DE SER ANALISADO E INTERPRETADO



FONTE: A autora (2021).

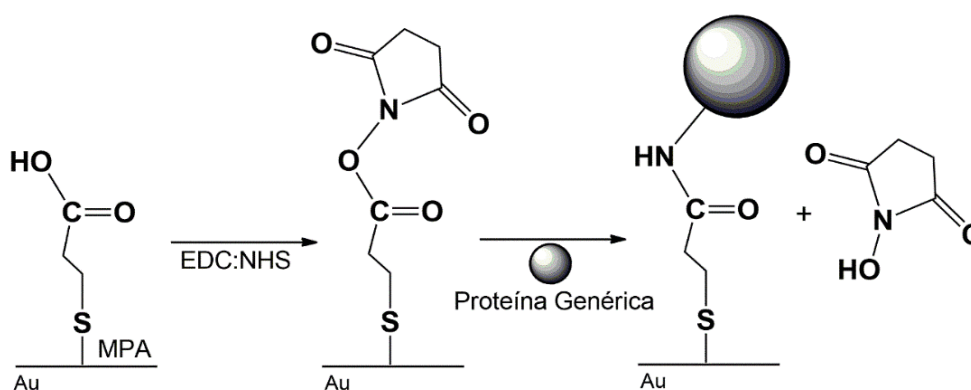
Para a sua construção, levando em consideração o sistema de reconhecimento e o tipo de transdutor empregado, diferentes estratégias podem ser adotadas. A etapa de imobilização do bioreceptor na superfície do transdutor é de extrema importância para a qualidade de resposta dos biossensores construídos, já que a atividade do elemento imobilizado é altamente dependente de sua orientação final e do ambiente químico em que se encontra (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002).

Uma das técnicas mais utilizadas para a funcionalização dos biossensores baseia-se na formação de monocamadas auto-organizadas, conhecidas como SAMs (do inglês *self-assembled monolayers*), que são facilmente produzidas em laboratório e requerem uma pequena quantidade de reagentes, além de permitirem uma ligação covalente do bioreceptor com o transdutor, o que confere ao sistema elevada estabilidade (LOVE et al., 2005; SAMANTA; SARKAR, 2011). Sua estrutura é usualmente formada a partir de cadeias longas alifáticas que se auto-organizam sobre uma superfície metálica, por consequência de interações hidrofóbicas, formando uma camada fina altamente organizada de orientação específica. No final da cadeia carbônica normalmente encontram-se grupos funcionais, como $-OH$, $-COOH$ e $-NH_2$, passíveis de serem explorados em etapas futuras para a ligação do bioreceptor (GRIESHABER et al., 2008). Esse tipo de modificação exibe uma boa organização das estruturas, que conferem elevada homogeneidade na superfície do eletrodo, culminando em maior sensibilidade e reprodutibilidade ao mesmo. O ácido 3-mercaptopropiônico (MPA), por exemplo, é um alcanotiol que apresenta o átomo de enxofre no grupo terminal ($-SH$) que se liga fortemente ao ouro, proporcionando infinitas possibilidades de aplicação biológica. Por possuir uma cadeia menor, costuma apresentar empacotamento menos ordenado, porém permite uma rápida transferência de elétrons para a superfície do eletrodo, o que pode ser um diferencial dependendo da técnica de transdução de escolha (FREIRE; PESSOA; KUBOTA, 2003).

Quanto a ativação dos grupos funcionais terminais, diferentes mecanismos podem ser empregados, como por exemplo a reação de substituição nucleofílica (SAMANTA; SARKAR, 2011). Neste trabalho, após a funcionalização via formação de SAMs, os grupos carboxílicos terminais da molécula dos tióis expostos foram ativados via EDC:NHS (reação representada na FIGURA 2), baseada na reação de uma

carbodiimida (EDC) com grupos carboxilatos, presentes nos alcanotióis via mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), formando como produto ésteres que interagem com grupos nucleofílicos presentes em diversos compostos de natureza biológica, como grupos aminas, para finalmente formar amidas, sendo esse um processo de funcionalização via ligação covalente. O NHS é adicionado para promover estabilidade ao intermediário formado com o EDC (o-Acilsouréia), formando então um éster mais estável, permitindo uma reação mais eficiente com a amina primária (SAM et al., 2010). Na FIGURA 2 está ilustrada a estrutura do MPA ligado a uma superfície de ouro antes e após sua reação com os agentes de acoplamento EDC:NHS, com posterior imobilização covalente de uma proteína genérica.

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DE REAÇÃO DE ATIVAÇÃO DO ÁCIDO 3-MERCAPTOPROPIONICO SOBRE SUPERFÍCIE DO OURO COM EDC e NHS



FONTE: A autora (2020).

Biossensores podem oferecer análises rápidas, simples e portáteis de amostras complexas, sendo uma plataforma altamente aplicável em estudos clínicos, químicos, ambientais e farmacêuticos, o que a torna uma alternativa promissora para diversos sistemas bioanalíticos. Diversas características destes dispositivos devem ser consideradas, como custo de produção dos eletrodos, custo de instrumentação e habilidade de miniaturização. Biossensores eletroquímicos utilizam-se de técnicas de transdução eletroquímicas e são amplamente utilizados justamente por apresentarem relativo baixo custo, alta sensibilidade, possibilidade de miniaturização do sistema e facilidade de operação (PRODROMIDIS, 2010; UYGUN; ERTUĞRUL UYGUN, 2014).

Já biossensores óticos, baseados na interpretação de mudanças óticas do sistema, possibilitam uma análise direta de diversas substâncias, em tempo real, e sem a necessidade de marcadores. A ressonância plasmônica de superfície, dentro das técnicas óticas, possibilita a observação em tempo real de diversas interações

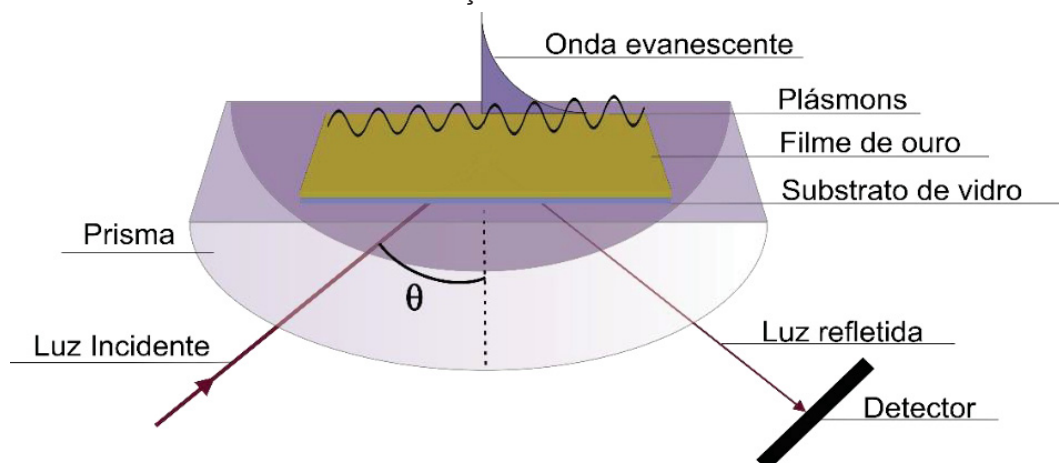
biomoleculares, fornecendo informações importantes de velocidade de reação, afinidade, entre outras propriedades cinéticas e termodinâmicas, sendo uma poderosa técnica de caracterização para esses eventos (DAMBORSKÝ; ŠVITEL; KATRLÍK, 2016).

2.2 RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE

O uso de biossensores baseados na ressonância de plásmons de superfície (SPR, do inglês *surface plasmon resonance*) cresceu significativamente nos últimos anos como novas metodologias de diagnósticos em análises clínicas. A técnica possibilita medições em tempo real com excelente sensibilidade e reprodutibilidade, permitindo a determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos importantes, proporcionando uma análise da afinidade de ligação entre diferentes proteínas e anticorpos de diferentes doenças (COOPER, 2003; SINGH, 2016).

O princípio de funcionamento da técnica de SPR é baseado em oscilações de cargas (chamados plásmons de superfície) na interface entre materiais dielétricos (como o ar) e metálicos (como Au e Ag), os quais criam campos eletromagnéticos perpendiculares à superfície metálica, que decaem exponencialmente em direção oposta à superfície do metal. Nos equipamentos que operam através da configuração de Kretschmman (FIGURA 3), que é baseada no fenômeno da reflexão interna total atenuada, essa oscilação é excitada por radiações eletromagnéticas (geralmente raios laser com comprimento de onda fixo), as quais têm suas intensidades vetoriais intensificadas quando atravessam um material de elevado índice de refração (geralmente um prisma). Essa onda incidente quando em contato com a superfície do condutor metálico gera onda evanescente causada pela excitação dos plásmons que se propagam na interface dielétrico-metal, onde, dependendo da interação desses com o meio, poderá causar uma mudança específica no ângulo de reflexão, detectadas pelo fotodiodo. A mudança da interação entre a onda incidente e a onda plasmônica ocorre em virtude da alteração do índice de refração nas proximidades da interface metal-dielétrico, que é o fator responsável pela mudança na constante de propagação dos plásmons de superfície (onda plasmônica) (KRETSCHM et al., 1968).

FIGURA 3 – ILUSTRAÇÃO DO FUNCIONAMENTO DO SENSOR DE SPR ATRAVÉS DA CONFIGURAÇÃO DE KRETSCHMANN



FONTE: A autora (2021).

2.3 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA

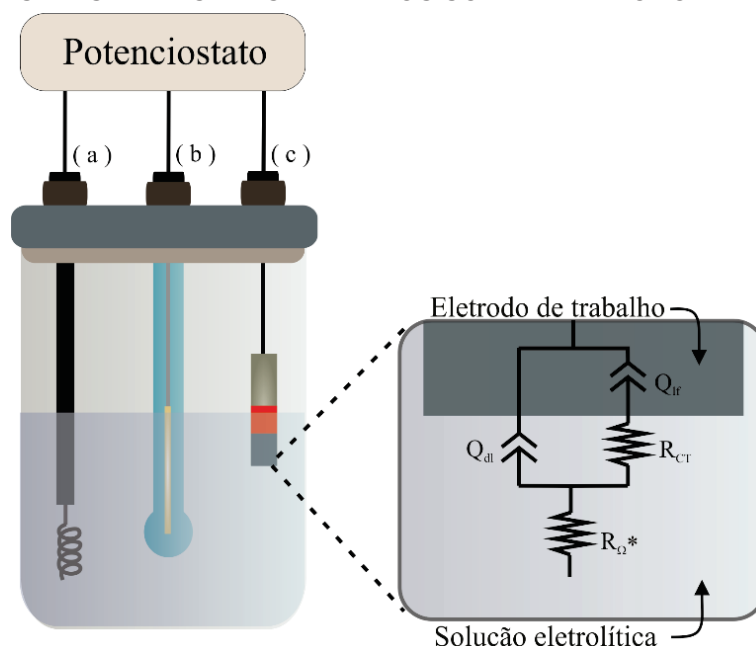
A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês *electrochemical impedance spectroscopy*), dentro das técnicas eletroquímicas, oferece uma das maiores sensibilidades, além de fornecer importantes informações interfaciais, sendo abundantemente utilizada para a caracterização de diferentes sistemas eletroquímicos (UYGUN; ERTUĞRUL UYGUN, 2014). Baseia-se na aplicação de pequenas perturbações, de potencial ou corrente, alternando o sinal em pequenas magnitudes, o que permite observações próximas ao estado de equilíbrio. Tal propriedade facilita o tratamento para obtenção de parâmetros cinéticos e difusionais, com a preferência de obter respostas simples de acordo com as características da perturbação aplicada (BARD; FAULKNER, 2001; CARVALHO et al., 2006).

A resposta obtida em diferentes frequências é de natureza sinusoidal, e pode diferir em fase e amplitude do sinal aplicado. A medida dessas diferenças permite a análise de processos que ocorrem no eletrodo, como difusão, cinética, dupla-camada elétrica, reações homogêneas associadas (BRETT; BRETT, 1993). Sua aplicação em reconhecimento biomolecular se baseia na ligação específica de diferentes biomoléculas na superfície modificada, que proporciona uma mudança das propriedades interfaciais do eletrodo, sensibilizada pela EIS (BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2016).

Existem diferentes abordagens para interpretação dos dados obtidos pela técnica, porém, uma das mais utilizadas é baseada na comparação do sistema da célula eletroquímica com um circuito equivalente que combinam, na maioria das vezes, capacitância e resistência (indutância somente é considerada quando aplicada frequências maiores que 100 kHz) para facilitar a interpretação dos espectros de impedância gerados (BRETT; BRETT, 1993; DAMOS; MENDES; KUBOTA, 2004). A utilização desses circuitos equivalentes possui como base a similaridade entre o comportamento da célula com esses componentes de circuitos elétricos: a dupla camada elétrica se assemelha a um capacitor (contribuição de processos capacitivos), e a resistência de transferência de carga entre a solução e a superfície do eletrodo seria análogo a um resistor (DAMOS; MENDES; KUBOTA, 2004). Cada sistema eletroquímico deve ser analisado exclusivamente para que os elementos do circuito equivalente sejam física e quimicamente compatíveis com os fenômenos que ocorrem na interface analisada.

Usualmente, a impedância é expressa por número complexo, em que a resistência ôhmica é representada pela componente real (corrente em fase com a perturbação aplicada), e a reatância capacitiva pela componente complexa (corrente fora de fase com a perturbação aplicada). Para a obtenção de uma resposta linear que permite a análise por meio de circuitos equivalentes mais simples, a tensão ac aplicada (AC, do inglês *alternating current*) deve ser pequena. O formato mais popular em biossensores de expressar os dados impedimétricos é através do gráfico de Nyquist, onde a componente imaginária é relacionada a componente real em cada frequência de corrente alternada. Como limitação, a representação de Nyquist não fornece o valor de frequência para registro daquele ponto (MARCHESI, 2005; PRODROMIDIS, 2010). Na FIGURA 4 está exemplificado um sistema estudado por EIS via célula eletroquímica clássica de três eletrodos, onde os processos interfaciais estudados são representados pelas componentes de circuito elétrico (a) resistência elétrica (R) e (b) elemento de fase constante (Q), de um eletrodo de trabalho construído a partir de um polímero condutor, representados por circuito equivalente de Randles modificado, sendo esse o circuito equivalente utilizado ao longo deste trabalho (SOARES et al., 2019).

FIGURA 4 – EXEMPLO DE CÉLULA ELETROQUÍMICA CLÁSSICA DE TRÊS ELETRODOS (a) CONTRA-ELETRODO, (b) ELETRODO DE REFERÊNCIA, (c) ELETRODO DE TRABALHO (COMPOSTO DE POLÍMERO CONDUTOR), E OS RESPECTIVOS PROCESSOS INTERFACIAIS POSSÍVEIS DE SEREM CARACTERIZADOS SOBRE ELETRODO DE TRABALHO



FONTE: A autora (2021).

O circuito é constituído de uma resistência (R_{Ω}) referente a soma de cada resistência elétrica individual da célula eletroquímica (filme polimérico, substrato metálico, eletrólito, cabos, contatos, entre outros), resistência à transferência de carga (R_{ct}) – relacionada com a dificuldade/facilidade à transferência de cargas do processo faradaico na interface eletródo/eletrólito, capacitância da dupla-camada elétrica (Q_{dl}) – correspondente com a área superficial do eletródo, e capacitância de baixa frequência (Q_{lr}) – relativa com a intercalação de cargas no substrato em ordem de manter a neutralidade de carga durante as reações redox do polímero condutor. Ambas as capacitâncias citadas são consideradas como elementos de fase constante (Q), que apresenta um certo desvio “n” da idealidade em comparação com um capacitor tradicional – duas placas condutivas paralelas separadas por material dielétrico (MARCHESI et al., 2015; SOARES et al., 2019).

Além da técnica de transdução, é importante levar em consideração a estratégia de ancoramento do bioreceptor, sendo tal etapa crucial para um bom desempenho analítico destes dispositivos. Ainda, a utilização de eletrodos de elevado custo, como eletrodos de ouro, platina, entre outros, podem ser uma barreira na aplicação de sensores impedimétricos para o diagnóstico de doenças para regiões mais carentes, ou com necessidade de alto volume de testagem, sendo interessante

o desenvolvimento de sensores passíveis de descarte, ou seja, que apresentem um substrato de baixo custo, sem a necessidade de reaproveitamento do mesmo, com alta diversidade de aplicação e possibilidade de produção em massa.

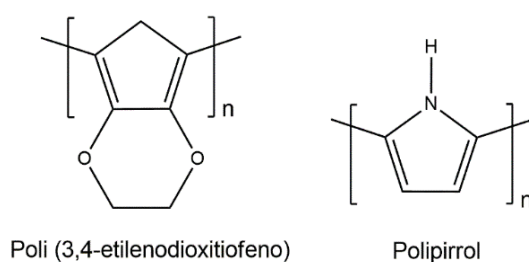
Os polímeros condutores apresentam síntese rápida e propriedades elétricas e ópticas que favorecem sua aplicação em diferentes áreas da química. Além disso, podem ser formados através de sua deposição sobre materiais de baixo custo, que permitem seu descarte e diminuição no custo por análise do sensor, além de fornecerem um bom ambiente químico para o futuro ancoramento do bioreceptor (WALLACE; SMYTH; ZHAO, 1999).

2.4 POLÍMEROS CONDUTORES E ELETRODOS MODIFICADOS

Para o desenvolvimento de novas metodologias eletroanalíticas, uma das tendências da área é a associação de técnicas eletroquímicas com o desenvolvimento de materiais e nanotecnologia. Polímeros condutores (PC) representam uma classe de materiais poliméricos que possuem condutividade intrínseca, apresentando propriedades óticas e elétricas interessantes para diversas aplicações, como condutividade elétrica, baixa energia de transição ótica e baixo potencial de ionização, além de possuírem estabilidade e homogeneidade satisfatórias (WONG et al., 2018). Sua condutividade é consequência da sobreposição de orbitais moleculares parcialmente preenchidos (a partir de ligações π conjugadas) que permitam a formação de funções de onda moleculares deslocalizadas, resultando num livre movimento de elétrons ao longo de sua estrutura (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002). A cadeia polimérica pode, a partir de processos de dopagem e desdopagem, causar variações na condutividade do material, e tal propriedade é altamente explorada na construção de sensores poliméricos (XIA; WEI; WAN, 2010). Em seu estado natural, os PCs exibem propriedade de semicondutor, e a partir da oxidação e redução dos sistemas π -conjugados (dopagem) podem apresentar melhores condutividades (NAVEEN; GURUDATT; SHIM, 2017). A síntese dos polímeros pode ser realizada tanto por rotas químicas quanto por rotas eletroquímicas, sendo o preparo por meios eletroquímicos vantajoso quando considerado o controle de suas propriedades, morfologia, condutividade e espessura, além da rapidez do preparo do material (WALLACE; SMYTH; ZHAO, 1999).

O PEDOT e o PPy estão entre os polímeros condutores mais populares para aplicação em biossensores, ambos apresentando excelente biocompatibilidade, fornecendo assim um bom ambiente químico para o ancoramento de bioreceptores. O PEDOT destaca-se por conta de sua alta estabilidade e alta condutividade, já o PPy por conta de sua fácil polimerização em soluções aquosas, boa condutividade e estabilidade (WANG et al., 2018). Ambos apresentam eletroatividade em solução tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*), permitindo dispensar a utilização de sondas eletroquímicas para avaliação dos processos redox em sua interface, facilitando sua aplicação (HRYNIEWICZ et al., 2019). As respectivas estruturas químicas do PEDOT e do PPy encontram-se na FIGURA 5.

FIGURA 5 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DO PEDOT E PPy



FONTE: A autora (2021).

Por outro lado, polímeros condutores podem apresentar baixa estabilidade mecânica gerada pelo processo de entumescimento e encolhimento resultante de processos faradaicos e baixa área eletroativa efetiva. Para superar essas limitações do material buscam-se alternativas como a hibridização com nanoestruturas metálicas, como o ouro, que podem acarretar numa maior estabilidade do material polimérico além de aumentar sua área eletroativa e condutividade (AQRAWWE et al., 2019; MERCANTE et al., 2017).

Nanopartículas de ouro (AuNPs) apresentam características físico-químicas distintas quando comparadas a sua forma não nanométrica, que as caracterizam como bons elementos para a fabricação de novos biossensores. Um de seus maiores benefícios é a biocompatibilidade a partir da utilização de ligantes apropriados, como a utilização de tióis, já reportados anteriormente. Os sinais gerados a partir do evento de ligação dessas nanopartículas podem ser monitorados por efeito plasmônico, condutividade, eletroatividade, entre outros (SAHA et al., 2012).

Um biossensor eletroquímico composto de PPy e AuNPs foi obtido por Avelino e colaboradores para o diagnóstico do papilomavírus humano (HPV, do inglês *Human papiloma virus*) utilizando tiras de polietilenotereftalato modificadas com óxido de índio-estanho (ITO). PPy e AuNPs foram eletroquimicamente sintetizados, e oligonucleotídeos, especialmente desenvolvidos para reconhecimento de genes do HPV, foram covalentemente imobilizados sobre a plataforma nanoestruturada a partir de uma SAM de cisteamina ativada com glutaraldeído. A detecção dos genes foi realizada voltametricamente, atingindo limites de detecção e quantificação 0,89 e 2,70 pg μL^{-1} , respectivamente (AVELINO et al., 2021).

A utilização de PEDOT decorado com AuNPs foi explorado por Yihui Ma e colaboradores a partir da eletropolimerização do EDOT (em solução com PSS) em nano-esferas monodispersas de poliestireno (template), após síntese dissolvidas, resultando no PEDOT nanoporoso. Depois, o material foi decorado com nanopartículas de ouro, e modificado através da imobilização de oligonucleotídeos para detecção voltamétrica do biomarcador de câncer microRNA24, exibindo limite de detecção de 0,38 fmol L^{-1} (MA et al., 2021).

Evidencia-se que a utilização de polímeros condutores para a construção biossensores permite configurações variadas, desde a modificação de materiais de suporte de baixo custo, até o aprimoramento de suas propriedades analíticas a partir de sua associação com materiais nanoestruturados. Dessa maneira, os PCs associados a nanopartículas de ouro têm demonstrado potencial de utilização em biossensores para diversos sistemas de alta relevância atuais, como a COVID-19 (TRAN et al., 2021).

2.5 COVID-19

Em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, China, deu-se início a uma pandemia do novo coronavírus, chamado de SARS-CoV-2, e sua doença foi denominada COVID-19. Sua contaminação, realizada por contato humano, é similar a outras gripes, apesar de supostamente ter origem zoonótica, a partir de vírus presentes em morcegos (ZHOU et al., 2020). Esses vírus pertencem à família Coronaviridae, ordem Nidovirales, e são denominados de tal maneira por conta de

sua estrutura externa similar à uma coroa, causada por uma projeção superficial (peplômeros) formada por glicoproteínas (STURMAN; HOLMES, 1983).

Os sintomas mais comuns da doença incluem febre, tosse seca, cansaço, e dificuldade para respirar, sendo que os casos mais graves evoluem para uma pneumonia. Como sintomas menos comuns temos diarreia, vômito, dor de garganta, conjuntivite, dor de cabeça, congestão nasal, perda de olfato e paladar e descoloração nos dedos das mãos e pés. Evidências mostram que o vírus pode afetar diferentes órgãos e tecidos, como coração, rim, fígado, olhos, intestino, cérebro e vasos sanguíneos, apesar do órgão mais afetado em geral ser o pulmão. Em média demora de 5 a 6 dias para que a pessoa infectada apresente sintomas, porém pode chegar a até 14 dias (WHO, 2021). Além disso, observa-se uma alta taxa de contágio do vírus associada a casos assintomáticos ou pré-assintomáticos, intensificando ainda mais a necessidade de detecções rápidas e adequadas de indivíduos contaminados (JI et al., 2020).

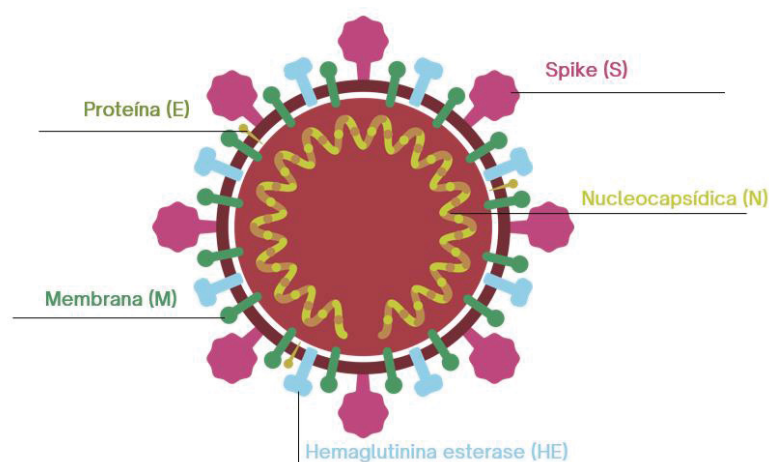
Pelos motivos apresentados, diagnósticos têm sido essenciais para tomada de decisões de isolamento e tratamento, o que diminui a taxa de propagação da doença significativamente (MORALES-NARVÁEZ; DINCER, 2020). Os benefícios de um número significativo de testagem em população incluem: (1) evitar contaminação a partir do monitoramento e isolamento de pessoas que tiveram contato com casos positivos da doença, (2) melhor estimativa da taxa de mortalidade, (3) maior previsão de casos leves, graves e críticos, permitindo melhor gerenciamento do problema (CIRAKLI; DOGAN; GOZLU, 2021). Como exemplo de sucesso em número de testagem observa-se a Coreia do Sul que optou por uma testagem em massa, rastreando eficientemente aqueles infectados e possíveis indivíduos expostos por estes. Dessa maneira, não foi implementado um *lockdown* (fechamento) de cidades inteiras para evitar uma propagação exponencial do vírus, e sim de grupos mais específicos de maior potencial disseminação, diminuindo o impacto econômico que medidas de isolamento mais restritivos normalmente ocasionam (LEE; LEE, 2020).

Dentro dos testes disponíveis, a reação em cadeia da polimerase (RT-PCR, do inglês *reverse-transcriptase polymerase chain reaction*) é o teste de diagnóstico classificado como padrão ouro pela WHO. Sua ação implica na amplificação de materiais genéticos presentes em baixas concentrações, o que proporciona uma detecção significativamente sensível e seletiva. Porém, a técnica apresenta diversas

desvantagens, como (1) a necessidade de realização dos testes em centros de diagnósticos especializados, (2) o tempo necessário para apresentação do resultado da técnica, podendo variar de 4 horas a 3 dias, (3) a amostragem pode apresentar alta taxa de erro por parte do analista, (4) necessidade de preparo da amostra antes da análise e dificuldade no transporte da mesma (material genético pode desnaturar durante o processo), (5) dificuldade de diagnosticar casos assintomáticos e (6) material genético do vírus pode ainda estar presente em pacientes recuperados, o que pode resultar em resultados falso-positivos de reinfecção (MORALES-NARVÁEZ; DINCER, 2020).

De maneira geral, as formas de detecção disponíveis se baseiam na detecção do gene viral, do anticorpo humano e na detecção do antígeno viral (FILIZTEKIN; OZKAYA, 2021). A estrutura do novo coronavírus é esférica e possui diâmetro de, em média, 80 a 120 nm. Uma representação geral da estrutura do vírus está disposta na FIGURA 6.

FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO DO NOVO CORONAVÍRUS E SUAS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS



FONTE: A autora (2021).

No envelope viral é possível observar três proteínas, (1) a S (*spike*), a mais proeminente, responsável pela interação da célula viral com a membrana da célula receptora, (2) a M (membrana), a proteína mais abundante nos coronavírus, responsável pela forma do vírus (esfera), e (3) a proteína E (envelope), sendo essa um pequeno polipeptídeo (MASTERS, 2006). Já os componentes internos do vírus correspondem a proteína N (do nucleocapsídeo) e ácido ribonucleico (RNA, do inglês

ribonucleic acid) de fita simples. A proteína N é estrutural, e sua função envolve auxiliar a formação do capsídeo (capa proteica) (LIMA et al., 2020).

Sabe-se que anticorpos produzidos para a proteína S oferecem neutralização e proteção contra o vírus, e é a proteína mais abundante na resposta imunológica e mais explorada no desenvolvimento de diagnósticos rápidos. Também é de conhecimento que a resposta imunológica em relação a proteína N pode aumentar a possibilidade de recuperação da infecção causada pelo coronavírus, podendo ser um potencial antígeno explorado no desenvolvimento de vacinas e métodos de diagnóstico (ASADUZZAMAN; HOSSAIN; ABUL, 2020; ZHAO et al., 2005).

A maior dificuldade no desenvolvimento de testes sorológicos é a reação cruzada do antígeno selecionado com outros anticorpos de doenças normalmente similares, podendo gerar falsos positivos, além de possível falta de sensibilidade, ocasionando falsos negativos (FILIZTEKIN; OZKAYA, 2021). Porém, tais metodologias normalmente apresentam resultados rápidos, essenciais para a quantidade de testes necessários em nível mundial durante a atual pandemia de COVID-19. Biossensores são alternativas interessantes para serem empregados para superar as dificuldades encontradas no diagnóstico de COVID-19, tanto para a detecção de vírus, como para a detecção mais precisa e sensível de anticorpos, especialmente se apresentarem baixo custo em seu preparo, rápida resposta e não necessidade de utilização de mão de obra altamente especializada, além de elevada sensibilidade e seletividade (JI et al., 2020; STEINER et al., 2020; XI; JUHAS; ZHANG, 2020).

Biossensores eletroquímicos têm-se destacado na literatura para o desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico a partir da detecção de antígenos e anticorpos da COVID-19. Por apresentarem elevada versatilidade, diferentes abordagens foram reportadas na literatura, explorando a possibilidade de portabilidade (EHSAN; KHAN; REHMAN, 2021; ZHAO et al., 2021), baixo custo (TORRES et al., 2021), velocidade de resposta (MOJSOSKA et al., 2021) e, até mesmo, sensores do tipo vestíveis (KIM et al., 2021). Como alternativa para eletrodos descartáveis de baixo-custo, polímeros condutores também podem ser explorados para o desenvolvimento de novas tecnologias para o diagnóstico da COVID-19, uma vez que além de biocompatíveis, podem apresentar flexibilidade de acordo com a necessidade (TRAN et al., 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Desenvolvimento de imunossensores impedimétricos descartáveis, utilizando eletrodos de malha de aço modificados com polímeros condutores (PEDOT e PPy) decorados com AuNPs, para aplicação no diagnóstico sorológico da COVID-19.

3.2 ESPECÍFICOS

- Uso da técnica de SPR para avaliação inicial da imobilização covalente da proteína N (COVID-19) sobre superfície de ouro (chip sensor de SPR modificada com SAM de tiol), e estudo da interação da proteína N com anticorpos específicos presentes em soros;
- Caracterização eletroquímica, espectroscópica e microscópica da síntese eletroquímica de PEDOT:PSS-AuNPs e investigação da utilização da plataforma na construção de biossensores:
 - Utilização da plataforma para o estudo de interações antígeno-anticorpo, explorando tal interação através de um sistema modelo bem estabelecido na literatura (avidina/biotina);
 - Aplicação da plataforma como metodologia de diagnóstico sorológico da COVID-19, a partir de sistemática previamente estabelecida em etapas anteriores.
- Caracterização eletroquímica, espectroscópica e microscópica da síntese eletroquímica do PPy:PSS-AuNPs e investigação da utilização da plataforma na construção de biossensores:
 - Obtenção de parâmetros analíticos (LOD e LOQ) a partir da exposição do biossensor a anticorpos monoclonais para a proteína N.
 - Aplicação da plataforma para utilização como metodologia de diagnóstico sorológico da COVID-19.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes de grau analítico utilizados e soluções preparadas neste trabalho estão listados a seguir: etilenodioxitiofeno 97% (EDOT), poli(4-estirenosulfonato de sódio) (PSS), pirrol (Py), ácido tetracloroáurico (III) tri-hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido 3-mercaptopropionico (MPA), ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (EDC), N-hidroxissuccinimida (NHS), ácido 2-aminoacético (GLY) e ferricianeto de potássio (III), albumina de soro bovino (BSA, *heat shock fraction*, pH 7, 98%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos). O cloreto de potássio (KCl), sulfito de Sódio (Na_2SO_3), hidrogeno fosfato dissódico (Na_2HPO_4), fosfato monopotássico (KH_2PO_4), cloreto de sódio (NaCl), hidróxido de sódio (NaOH) e cloreto de potássio (KCl) foram adquiridos da LabSynth (São Paulo, Brasil). O etanol e o isopropanol foram obtidos de Biotec (São Paulo, Brasil), e o ácido sulfúrico (H_2SO_4) pela Alphatec (São Paulo, Brasil).

A solução PBS (pH 7,4, 0,1 mol L^{-1}) utilizada no decorrer de todo o trabalho foi preparada a partir da adição equimolar de 0,1 mol L^{-1} de KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , e KCl, com ajuste de pH por adição de KOH. Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água ultrapura (água 18 $\text{M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).

Os materiais biológicos utilizados nas diferentes etapas deste trabalho estão listados a seguir: avidina-HRP utilizada é uma proteína inteira nativa de frango conjugada com peroxidase (HRP, do inglês *horseradish peroxidase*). A anti-avidina é uma fração do anticorpo IgG policlonal da avidina imunizado em coelho, biotinilado com 10 a 20 moléculas de biotina via NHS. Esses reagentes biológicos foram adquiridos comercialmente (Abcam, Cambridge, Reino Unido).

Para os estudos relacionados à COVID-19, os materiais biológicos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Luciano Huergo do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. A expressão da proteína do nucleocapsídeo (proteína N) de SARS-CoV-2, foi realizada a partir de um gene sintético com códon otimizado que expressa a proteína N-SARS-CoV-2, obtido e clonado em pET28a pela General Biosystems. Este plasmídeo foi denominado pLHSarsCoV2-N e transformado em

Escherichia coli, cepa BL21, permitindo a expressão da proteína N marcada com His N-terminal. Após purificação, a proteína foi armazenada em alíquotas a 4 °C por uma semana ou a -20 °C por até dois meses. O anticorpo monoclonal para a proteína N do SARS-CoV-2 foi adquirido da Fapon Biotech (Dongguan, China).

Os soros humanos utilizados foram coletados de pacientes positivos e negativos para a COVID-19 no Hospital Erasto Gaertner (Curitiba, Brasil). Os casos de COVID-19 foram confirmados pela detecção do RNA de SARS-CoV-2 por RT-PCR de esfregaços de amostra de nasofaringe no laboratório de virologia. A utilização dessas amostras está amparada pelo parecer (n. 4.287.113) consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE n. 31592620.4.1001.0098) emitido no dia 18 de setembro de 2020 (ANEXO 1).

4.2 EQUIPAMENTOS

As medidas para caracterização das etapas envolvidas na construção dos sensores foram realizadas por voltametria cíclica (CV, do inglês *Cyclic voltammetry*), microscopia eletrônica de varredura (SEM, do inglês *Scanning electron microscope*), espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS, do inglês *Energy-dispersive X-ray spectroscopy*) e EIS. As medidas eletroquímicas foram realizadas em potenciostatos IviumStat XRe ou Metrohm DropSens STAT-I-400, em célula eletroquímica convencional com três eletrodos. O eletrodo de referência e contra eletrodo foram, respectivamente, Ag/AgCl/KCl_(sat) (prata/cloreto de prata) e fio de platina. As medidas de EIS foram realizadas a partir da aplicação de potencial alternado de 0,01 V em potencial de circuito aberto, e janela de frequência de 10 kHz a 10 mHz. Para garantir condições estacionárias na medida, foi aplicado o potencial de circuito aberto por 2 min antes das medidas. Os espectros de impedância adquiridos foram ajustados utilizando o software Zview (Scribner Associates, Carolina do Norte, Estados Unidos), obtendo resultados via modelagem de circuito equivalente, não excedendo o valor máximo de erro para cada parâmetro calculado de 10%.

As medidas de EDS e SEM foram obtidas em equipamento Tescan Vega 3 LMU, com detector para EDS tipo SDD de 80 mm², e por serem de material condutor, foram imobilizadas em suporte do microscópio utilizando fitas de cobre, realizadas no

Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR (CME). As análises de elétrons secundárias foram processadas no software MeX (Bruker Alicona, Estados Unidos).

As medidas ópticas do ângulo de SPR foram obtidas para analisar as interações biomoleculares usando um equipamento Autolab Springle (Eco Chemie), composto por um prisma e um disco de vidro recoberto com um filme nanométrico de ouro (50 nm). Possui uma célula com capacidade de 300 μL e sua fonte de radiação é um laser de Hélio/Neônio com emissão em 670 nm. A intensidade da luz refletida é medida através de um detector de fotodiodo, sendo a configuração utilizada baseada na reflexão interna total atenuada, configuração de Kretschmman. Os experimentos foram realizados em temperatura de $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. A limpeza do chip de SPR (substrato sensor), um disco de vidro recoberto com ouro, foi realizada a partir da imersão em solução piranha (mistura 1:3 H_2O_2 30% v v⁻¹ e H_2SO_4 concentrado) durante aproximadamente 1 min, seguido por banho ultrassônico por 5 min em acetona e em álcool isopropílico. Por fim, os substratos foram lavados (5 vezes) com água deionizada e posteriormente secos em atmosfera de nitrogênio.

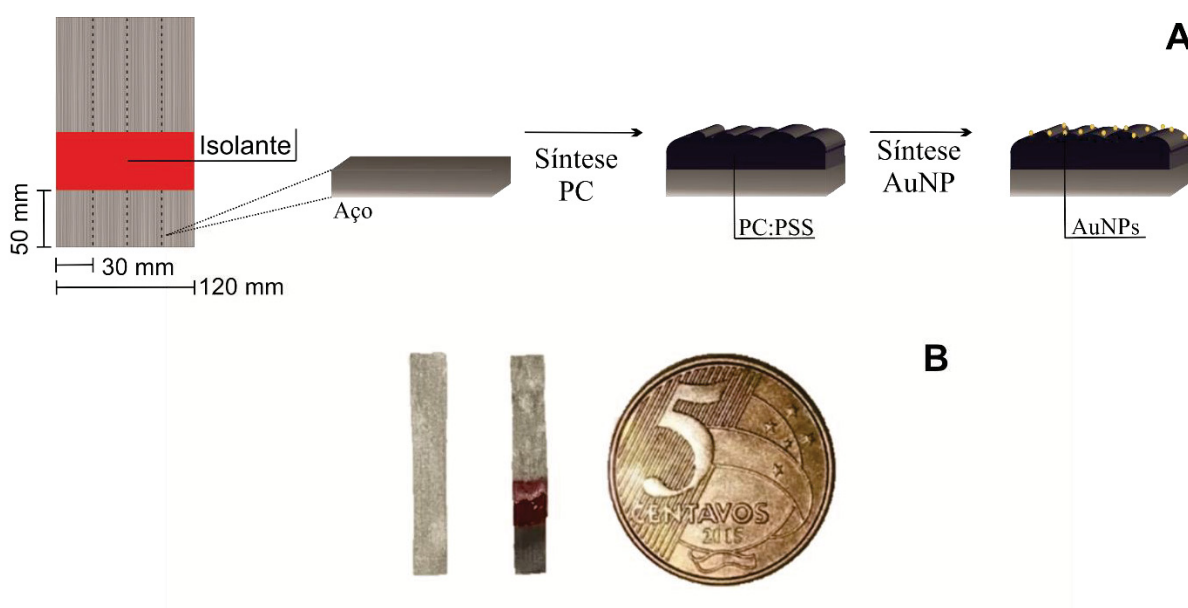
4.3 ELETROPOLIMERIZAÇÃO E INCORPORAÇÃO DE AuNP

Antes do processo de polimerização, a malha de aço (A105) de área total de 1,2 cm^2 por eletrodo, foi lavada em banho de ultrassom na presença de etanol por 15 min (SOARES et al., 2019; TAMBURRI et al., 2009). A eletropolimerização do monômero EDOT foi realizada potenciostaticamente, a partir da imersão do eletrodo de suporte (malha de aço) em solução EDOT e PSS (concentrações de 10 mmol L^{-1} e 7,0 g L^{-1} , respectivamente) e aplicação de potencial de 1,25 V, sendo a quantidade polimerizada de EDOT controlada pela quantidade de carga passada pelo eletrodo, de 100 mC cm^{-2} . Para a incorporação das nanopartículas de ouro no eletrodo previamente modificado com PEDOT:PSS, foi aplicado potencial de -1,1V até carga de 60 mC cm^{-2} com o eletrodo imerso em solução de ácido tetracloreáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), K_2HPO_4 $1,7 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$, Na_2SO_3 $3,6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e EDTA $4,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, todos adicionados na respectiva ordem, lentamente, para evitar escurecimento da solução. Os eletrodos modificados foram então estabilizados, submetendo-os a voltametria cíclica por pelo menos 5 ciclos. Foi realizada a síntese de 4 eletrodos por procedimento onde cada eletrodo apresentava dimensão final de

0,5 x 0,3 cm². Procedimento similar foi realizado para a síntese do eletrodo modificado de PPy:PSS-AuNP, porém na etapa de eletropolimerização foi utilizado potencial de 0,8 V em solução eletrolítica contendo 50 mmol L⁻¹ de pirrol e 14 g L⁻¹ NaPSS, com controle de carga de 800 mC cm⁻². Já para a síntese de AuNP foi utilizada solução eletrolítica e potencial similar, com exceção da carga de corte na síntese potenciométrica que foi de 300 mC cm⁻².

Na FIGURA 7-A é apresentado um esquema geral da síntese dos eletrodos propostos nesta etapa do trabalho e na FIGURA 7-B está representado o eletrodo final, PEDOT:PSS-AuNP, com área geométrica delimitada com esmalte, ao lado de objeto de referência para exemplificar tamanho final.

FIGURA 7 – ESQUEMA GERAL (A) DAS ETAPAS DE SÍNTESE ELETROQUÍMICA DOS ELETRODOS DE PEDOT E PPy (ILUSTRADOS COMO POLÍMERO CONDUTOR) SOBRE A MALHA DE AÇO A105 E POSTERIOR INCORPORAÇÃO DE AuNPs E IMAGEM (B) DO ELETRODO FINAL SINTETIZADO PRÓXIMO A UM OBJETO REFERÊNCIA



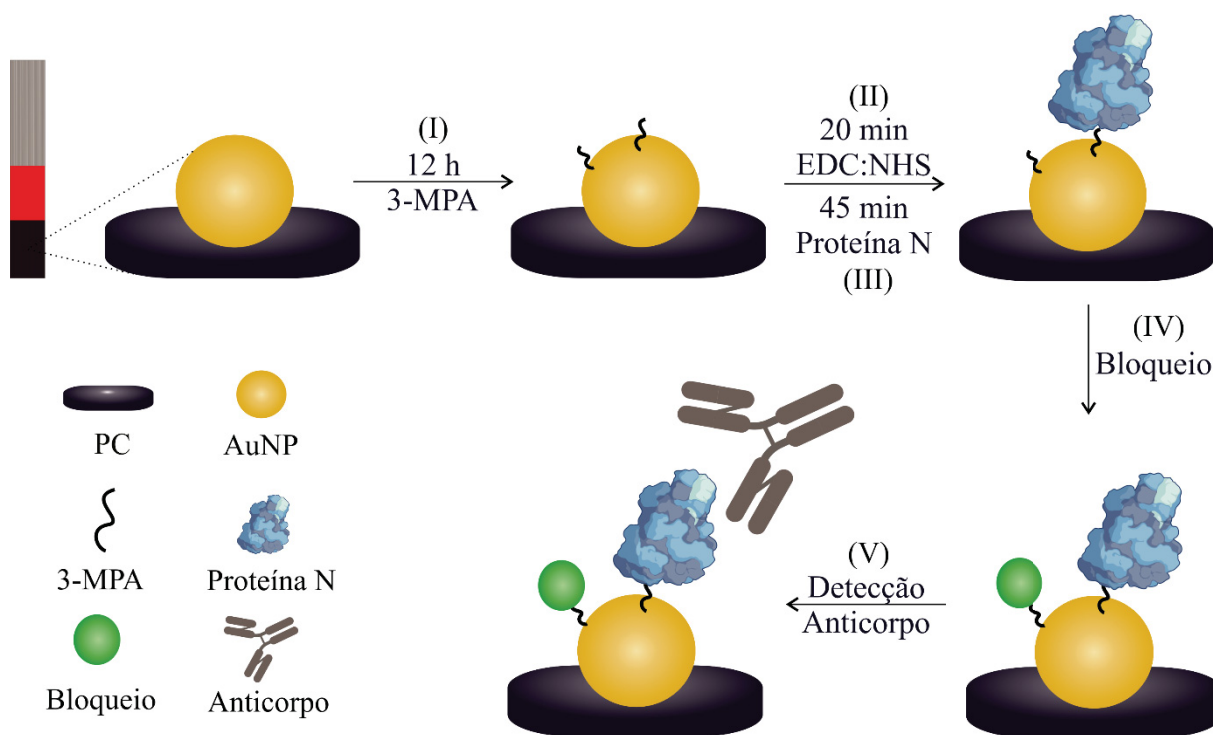
FONTE: A autora (2021).

4.4 CONSTRUÇÃO DOS BIOSSENSORES

A construção dos biossensores impedimétricos e sua utilização para detecção foi realizada a partir dos eletrodos de PEDOT:PSS-AuNP e PPy:PSS-AuNP anteriormente sintetizados, e eletrodo comercial de filme de ouro (área 0,032 cm²), de acordo com as etapas: (i) funcionalização, (ii) ativação, (iii) imobilização, (iv) bloqueio

e (v) detecção. Na FIGURA 8 está representado um esquema para cada etapa de construção dos sensores impedimétricos utilizados neste trabalho. Foi realizada a caracterização de cada etapa da construção do biossensor, com exceção da etapa de ativação devido à instabilidade dos ésteres formados nos grupamentos terminais do filme, e avaliação da influência da concentração do analito por impedância eletroquímica e voltametria cíclica. Para o eletrodo modificado com PPy:PSS foi também realizada uma caracterização por etapa a partir de espectroscopia na região do infravermelho, de 400 a 4000 cm^{-1} em espectrômetro Bruker, com resolução de 4 cm^{-1} em modo transmissão.

FIGURA 8 – ESQUEMA DAS ETAPAS UTILIZADAS PARA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSENSOR: (i) FUNCIONALIZAÇÃO, (ii) ATIVAÇÃO, (iii) IMOBILIZAÇÃO, (iv) BLOQUEIO E (v) DETECÇÃO



FONTE: A autora (2021).

As etapas envolvidas no processo de construção dos biossensores neste trabalho estão descritas a seguir:

- (I) Funcionalização: Os eletrodos modificados foram imersos em solução aquosa de MPA 1,0 mmol L^{-1} por 12 horas (*overnight*) em temperatura ambiente. Após, foi realizada uma etapa de lavagem imergindo o mesmo em água ultrapura por 5 min, para então ser encaminhado para o processo de ativação.

- (II) Ativação: foram imersos em solução aquosa consistindo da mistura NHS-EDC (15:10 mmol L⁻¹) por 20 min, seguida pela etapa de lavagem em água por cerca de 1 min.
- (III) Imobilização via ligação covalente: o eletrodo ativado foi imerso por 45 min em solução consistindo do bioreceptor (proteína N). As concentrações utilizadas dependeram de cada sistema estudado. Após a imobilização foi realizada uma etapa de lavagem com imersão do eletrodo biofuncionalizado em solução PBS por 5 min.
- (IV) Bloqueio: o eletrodo foi imerso em solução de glicina 100 mmol L⁻¹ (PEDOT:PSS) por 20 min com posterior imersão em solução PBS por 5 min para lavagem, ou em solução de BSA (PPy:PSS) 1% por 30 min com posterior lavagem por 10 min em PBS.
- (V) Detecção: os eletrodos previamente caracterizados via EIS foram imersos em solução por 30 min. Após a imobilização foi realizada uma etapa de lavagem em PBS por 5 min. Após período de incubação, os eletrodos foram encaminhados para medida de EIS.

Para as análises de SPR, cada chip de SPR (substrato sensor), previamente limpo a partir de metodologia reportada anteriormente, foi funcionalizado por sua imersão em solução de MUA 1,0 mmol L⁻¹ por pelo menos 12 horas, etapa seguida por suscetíveis lavagens com água para retirar excesso de moléculas presentes na solução. A partir dessa etapa, os discos foram inseridos no equipamento e o ângulo de SPR foi monitorado. Primeiramente, o ângulo foi monitorado com a adição de 100 µL de água ultrapura por pelo menos 5 min ou até estabilização da linha base. Então, as etapas de ativação, imobilização, bloqueio e detecção foram acompanhadas (caracterizadas) em tempo real, seguindo os procedimentos ii, iii, iv e v já reportados anteriormente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

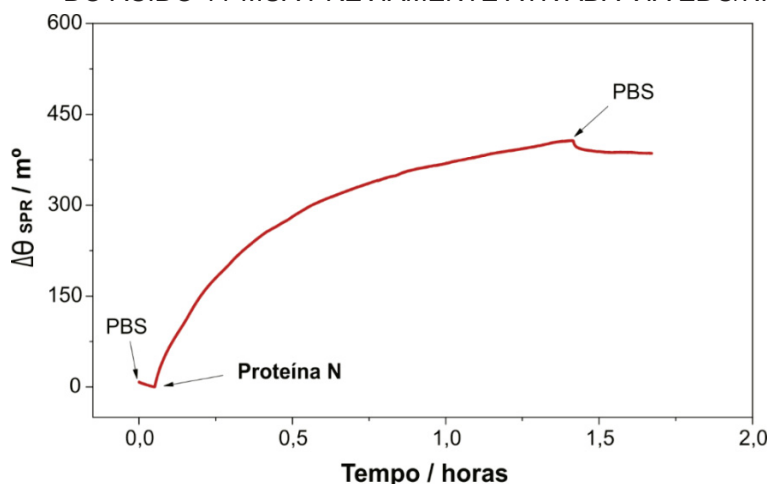
5.1 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO DA COVID-19 POR SPR

Anterior à construção do imunossensor impedimétrico, foi avaliado via técnica de SPR o comportamento cinético da reação entre a proteína recombinante N de SARS-CoV-2, frente a seus anticorpos específicos presentes em soros de pacientes que tinham sido detectados como positivos para a COVID-19. Para realização desses ensaios, inicialmente foi realizada a funcionalização do chip sensor de SPR a partir de sua imersão em solução etanólica de MUA 1 mmol L⁻¹ por 24 h. Com o auxílio da bioinformática, foi predito o ponto isoelétrico (pI) da proteína N igual a 8,15, o que torna sua carga líquida positiva em pH do tampão selecionado no decorrer deste trabalho (PBS pH 7,4). Dessa maneira, a cobertura da superfície modificada com SAM de alcanotiois pela proteína N pode ser favorecida, devido a interações eletrostáticas entre a proteína (carga líquida positiva) e a superfície do transdutor funcionalizada (carga líquida negativa) que podem ser observadas em pH 7,4 (MENDES et al., 2004; WELZEL; KNOLL; WERNER, 2005). Também foram previstas a quantidade de aminoácidos que compõem a proteína (456) e sua massa molecular (51,18 kDa = 51,18 x 10³ g mol⁻¹). A ligação da proteína N (utilizada em solução 15 µg mL⁻¹) aos grupos carboxílicos terminais da MUA foi realizada por meio dos agentes de acoplamento EDC:NHS (10:15 mmol L⁻¹). Na FIGURA 9 pode ser observada a caracterização por SPR da etapa de imobilização da proteína N sobre a SAM previamente ativada, evidenciado um aumento de $\Delta\theta_{SPR}$ em função do tempo de exposição da proteína sobre o disco sensor.

A partir da concentração da proteína N empregada, foi possível observar uma situação de pseudo-equilíbrio a partir de 1 hora de reação, sugerindo a saturação dos sítios disponíveis do filme para interação com a proteína e, portanto, elevada cobertura de superfície alcançada. Após o processo de imobilização, sucessivas adições de PBS (pH 7,40) foram acompanhadas por uma pequena diminuição na resposta, sugerindo que o bioreceptor apresentou-se fortemente ligado ao substrato sensor (disco de Au de SPR). Dessa maneira, foi possível concluir que a utilização da

SAM do tiol escolhido possibilitou imobilização eficiente do receptor sobre a superfície do substrato sensor de SPR.

FIGURA 9 – SENSORGRAMA ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$ VS. TEMPO) OBTIDO PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA N SOBRE CHIP SENSOR DE SPR, FUNCIONALIZADO COM SAM DO ÁCIDO 11-MUA PREVIAMENTE ATIVADA VIA EDC/NHS.



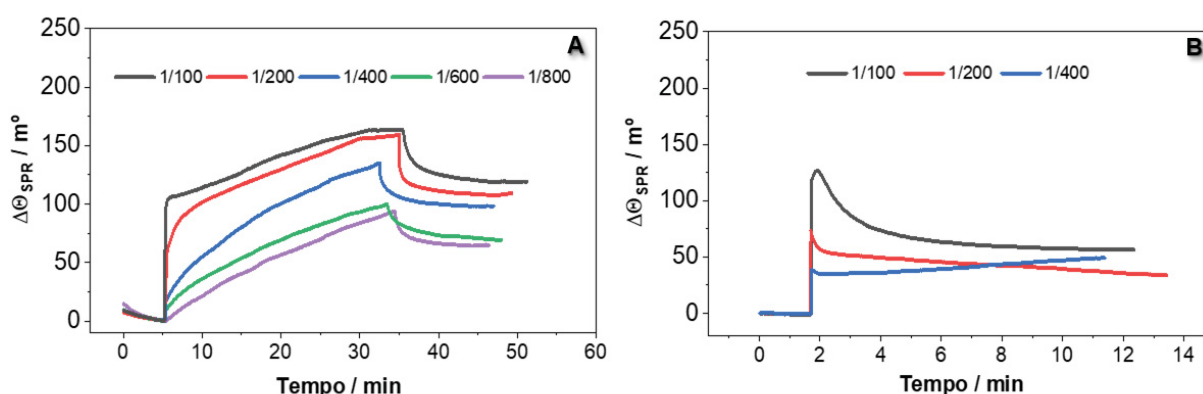
FONTE: A autora (2021).

Otimizada a etapa de imobilização da proteína, o bloqueio dos sítios reativos remanescentes da SAM foi realizado através de uma solução de glicina (100 mmol L^{-1} em PBS, pH 7,40) durante 5 min. Após essa etapa, o imunossensor foi exposto a diferentes soros humanos convalescentes (que não apresentam mais carga viral, porém apresentam anticorpos provenientes da resposta imunológica) em diferentes diluições. Para o primeiro soro positivo avaliado, previamente foi detectada sua elevada reatividade por meio do ELISA. Os fatores de diluição utilizados variaram de 1/800 a 1/100. Na FIGURA 10-A estão dispostas as curvas de SPR obtidas a partir da resposta do biossensor construído frente a diferentes concentrações de soro. Observa-se que o valor $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ apresentou resposta proporcional, ou seja, uma maior variação da resposta para uma maior concentração de soro, o que indicaria uma maior quantidade de anticorpos específicos. Em seguida, para cada fator de diluição, sucessivas adições de tampão foram realizadas para o processo de dissociação, observando-se uma diminuição de $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ devido a retirada de excesso de anticorpos não ligantes ou ligados fracamente sobre a superfície do chip sensor. Salienta-se que para todas as diluições testadas do soro, não foi alcançada uma condição totalmente estacionária, sendo atingido comportamento de pseudo-equilíbrio.

Para a utilização do biossensor como metodologia de diagnóstico, é importante que o mesmo proporcione respostas seletivas, não apresentando ou

minimizando reações cruzadas com outros anticorpos ou outras proteínas presentes na amostra. Por esse motivo, foi testada também a resposta do imunossensor construído para soros negativos (FIGURA 10-B). Para estes soros (FIGURA 10-B) foi observado um comportamento distinto do observado para soros positivos (FIGURA 10-A), o que demonstra uma possível resposta seletiva do dispositivo para anticorpos específicos da COVID-19. Para a diluição 1/400 foi observado um perfil característico de associação, porém para as diluições 1/100 e 1/200 o comportamento não apresentou o perfil esperado. Não foram obtidas respostas para diluições menores que 1/400.

FIGURA 10 – SENSORGRAMA ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$ VS. TEMPO DE REAÇÃO) EVIDENCIANDO OS PROCESSOS DE ASSOCIAÇÃO E DISSOCIAÇÃO APÓS ADIÇÃO DE DIFERENTES FATORES DE DILUIÇÃO (EM PBS) PARA (A) SORO POSITIVO E (B) SORO NEGATIVO PARA A COVID-19



FONTE: A autora (2021).

Em geral, foi possível observar a partir da utilização da técnica de SPR que a cinética da reação entre a proteína N de SARS-CoV-2 e seus anticorpos específicos é rápida, principalmente quando em concentrações mais elevadas de anticorpos. Nos instantes iniciais da reação observou-se elevada $\Delta\theta_{\text{SPR}}$, etapa esta seguida por uma etapa mais lenta caracterizada pelo aumento progressivo do sinal de SPR (condição de pseudo-equilíbrio). Esta segunda etapa ficou ainda mais evidente em concentrações menores dos soros testados.

Caracterizou-se a partir dos dados obtidos via SPR a interação antígeno-anticorpo em tempo real, sendo possível selecionar condições experimentais mais otimizadas de acordo com o tempo observado para cada etapa avaliada pela técnica de SPR para construção dos biossensores impedimétricos para COVID-19. Então, a etapa de imobilização do elemento de reconhecimento foi realizada em 1 h, com

detecção rápida de anticorpos, a partir de tempo de incubação de 10 min, o suficiente para obter variação dos parâmetros analisados, para evitar possíveis ligações inespecíficas, seguida de uma etapa de lavagem de 5 min em solução tampão.

Dessa maneira, apesar do princípio de funcionamento das técnicas serem completamente distintos, otimizou-se os parâmetros experimentais a partir da técnica de SPR, observando os tempos de interação em tempo real disponibilizados pela técnica, para a aplicação em biossensores impedimétricos passíveis de descarte. Neste caso, os sensores foram construídos a partir de eletrodos modificados com polímeros condutores e nanopartículas de ouro.

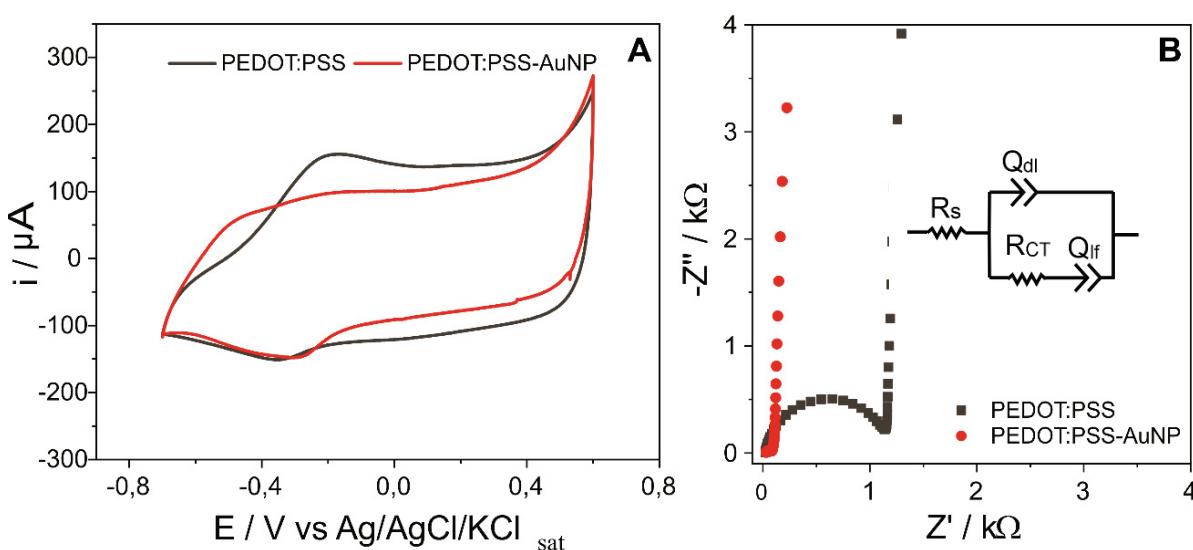
5.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS MODIFICADOS DE PEDOT:PSS-AuNP

A modificação do material de suporte descartável (malha de aço) por PEDOT:PSS-AuNP foi realizada em duas etapas, a primeira para a síntese eletroquímica do composto PEDOT:PSS sobre a malha, e outra etapa envolveu a eletrodeposição das AuNPs. A formação do PEDOT foi realizada de maneira já reportada na literatura, na presença de NaPSS em solução aquosa, com controle de sua espessura por carga de eletropolimerização (SOARES et al., 2019; TAMBURRI et al., 2009). Eletropolimerização de EDOT é normalmente realizada em solventes orgânicos, devido à sua baixa solubilidade em meios aquosos. A utilização de polieletrólitos, como PSS, possibilita a síntese eletroquímica do polímero em meios aquosos, sendo que o PSS promove também a formação de um composto com o PEDOT devido sua incorporação na matriz polimérica, compensando a carga positiva do PEDOT (TAMBURRI et al., 2009). Então, foi avaliada a construção dos eletrodos de PEDOT:PSS e a deposição das nanopartículas de ouro (AuNPs), sob malha de aço, em solução tampão fosfato salino (PBS), com pH de 7,4 como eletrólito. As técnicas de EIS, CV, SEM e EDS foram empregadas para caracterização dos eletrodos construídos.

A caracterização da eletrodeposição de AuNPs na matriz polimérica do PEDOT pôde ser observada a partir de técnicas eletroquímicas (CV e EIS), evidenciadas pelo voltamograma e espectro de impedância (diagrama de Nyquist) representados pela FIGURA 11. O comportamento típico do PEDOT:PSS para CV

(FIGURA 11-A) apresenta uma resposta com contribuição capacitiva e processos redox discretos. Após a eletrodeposição das AuNPs, foi observada uma mudança no comportamento voltamétrico, evidenciada pelo discreto deslocamento do processo de redução do polímero em -0,35 V para -0,27 V, e mudança na intensidade da onda voltamétrica de oxidação aproximadamente em -0,20 V.

FIGURA 11 – (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS REALIZADOS EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4), SOB VELOCIDADE DE VARREDURA 15 mV s⁻¹ PARA PEDOT E PEDOT-AU. (B) DIAGRAMA DE NYQUIST DOS ELETRODOS MODIFICADOS COM PEDOT:PSS E PEDOT:PSS-AUNP OBTIDOS EM POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) E SEU CIRCUITO EQUIVALENTE CORRESPONDENTE



FONTE: A autora (2021).

Já no gráfico de impedância eletroquímica (FIGURA 11-B) é possível observar um comportamento característico de polímeros condutores, com a presença de um semicírculo relacionado à resistência total do sistema, resistência a transferência de carga e a capacitância da dupla-camada elétrica de altas a médias frequências, seguido por uma reta em baixas frequências relacionada à intercalação de íons na matriz polimérica para manter a neutralidade de carga sob os processos oxidativos do polímero condutor (SOARES et al., 2019).

Na TABELA 1 estão inseridos os valores dos parâmetros obtidos pelo ajuste realizado a partir do circuito equivalente de Randles modificado representado na FIGURA 11-B. O circuito é constituído de uma resistência (R_s), resistência à transferência de carga (R_{ct}), capacitância da dupla-camada elétrica (Q_{dl}) e capacitância de baixa frequência (Q_{lf}). Ambas as capacitâncias citadas são consideradas como elementos de fase constante (CPE), onde 'n' seria o valor de

desvio da idealidade em comparação com um capacitor tradicional (duas placas condutivas paralelas separadas por material dielétrico), quanto mais próximo da unidade menor o desvio da idealidade (se $n \sim 1$, CPE $\sim$ capacitor puro).

TABELA 1 – PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS CALCULADOS A PARTIR DA MODELAGEM DOS DADOS DE EIS DO ELETRODO DE PEDOT:PSS ANTES E APÓS A ELETRODEPOSIÇÃO DAS AuNPs

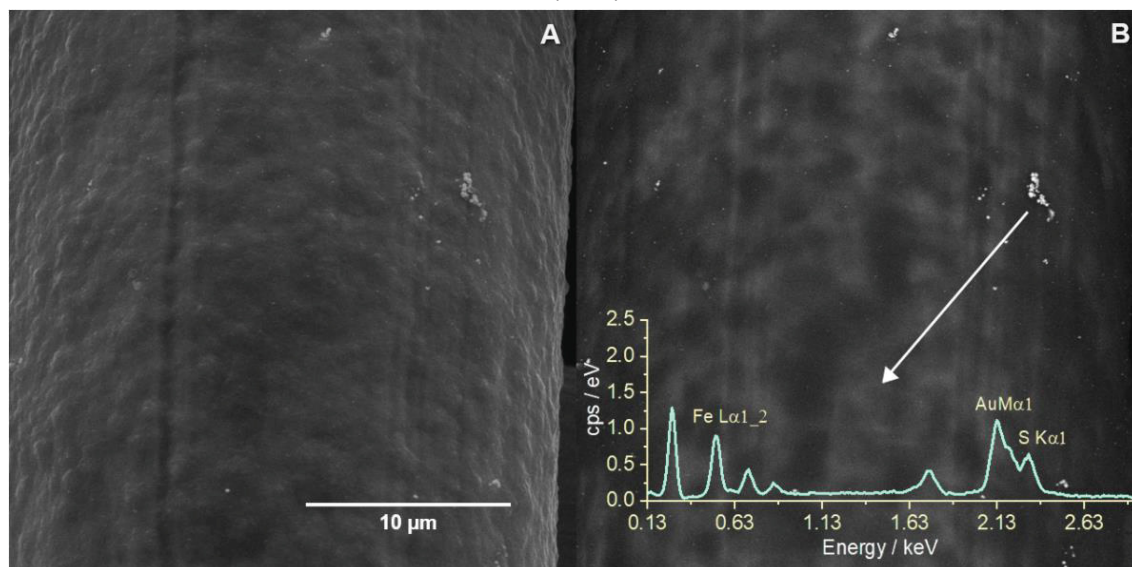
MODIFICAÇÃO	$R_s / k\Omega$	$Q_{dl} / 10^{-5} F s^{n-1}$	n_{dl}	$R_{ct} / k\Omega$	$Q_{lf} / 10^{-3} F s^{n-1}$	n_{lf}
PEDOT:PSS	0,024	1,89	0,90	1,15	1,58	0,98
PEDOT:PSS-AuNP	0,026	6,67	0,75	0,066	1,13	0,97

FONTE: A autora (2021).

Na TABELA 1 é possível observar mudanças significativas nos parâmetros R_{ct} (evidenciadas na FIGURA 11-B a partir do aumento do diâmetro do semicírculo) e Q_{dl} quando comparado PEDOT:PSS e PEDOT:PSS-AuNP. Esse comportamento está relacionado com o favorecimento dos processos faradâicos do material polimérico a partir da inserção das nanopartículas de ouro, que conferem ao material uma menor resistência à transferência de carga, além de aumentarem a área superficial ativa do material, o que justificaria o aumento no valor do Q_{dl} . Foi possível observar também uma alteração no valor de n_{dl} , indicando um afastamento da condição de capacitor ideal quando incorporada as nanopartículas de ouro, podendo ter relação com a uniformidade da superfície, aumentando a rugosidade da superfície quando agregadas as AuNPs.

Com o propósito de corroborar a caracterização com relação à deposição das nanopartículas metálicas e a formação do filme polimérico pela rota sintética explorada neste trabalho, foram realizadas imagens de SEM para o PEDOT:PSS-AuNP (FIGURA 12). A morfologia do material sintetizado pôde ser observada nas imagens presentes na FIGURA 12-A, destacando-se a formação de um filme fino sobre a malha, de morfologia globular característica para polímeros condutores eletrodepositados (LANG et al., 2009; SOARES et al., 2019).

FIGURA 12 – IMAGENS REPRESENTATIVAS DE SEM PARA PEDOT:PSS-AuNP SINTETIZADOS EM MALHA DE AÇO POR (A) ESPALHAMENTO DE ELÉTRONS (SE) E (B) RETROESPALHAMENTO DE ELÉTRONS (BSE) E O RESPECTIVO ESPECTRO DE EDS



FONTE: A autora (2021).

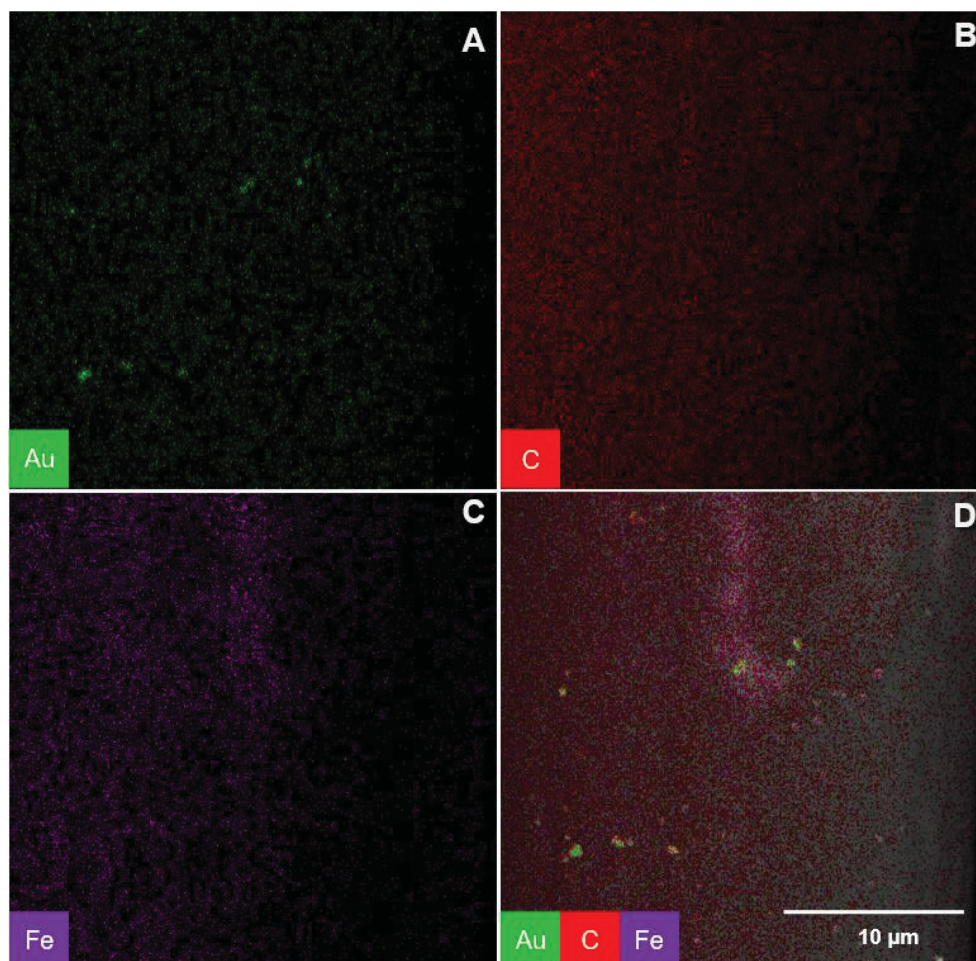
Foram utilizadas duas modalidades de microscopia, a SEM-SE e a SEM-BSE. Nas imagens SEM-SE (elétrons espalhados, do inglês *scattering electron*) o contraste é dado pelo relevo da amostra, sendo possível observar a morfologia do material, enquanto para SEM-BSE (elétrons retroespalhados, do inglês *backscattered-electron*) o contraste é dado a partir da diferença de massa atômica resultante da interação da radiação incidida com a amostra. Ou seja, no caso do ouro, por possuir maior densidade atômica que o ferro, carbono, enxofre, oxigênio e outros materiais presentes no sistema analisado, o mesmo é evidenciado por essa técnica microscópica (GOLDSTEIN et al., 2018).

Nas imagens de microscopia do PEDOT:PSS-AuNP na FIGURA 12-B foi comprovada a incorporação das nanopartículas de ouro a partir da identificação inicialmente de aglomerados de alta massa molecular evidenciados pelo modo BSE, sendo confirmada por EDS a presença do ouro (FIGURA 12-B). No espectro de EDS presente na FIGURA 12-B foi possível observar uma banda referente a transição de átomos de ouro na região de 2,1 keV, relacionada com a transição Au Mα1, indicada pelo software do equipamento utilizado (MUBARAKALI et al., 2011).

Com o objetivo de visualizar melhor a presença do elemento ouro na matriz polimérica, não somente em aglomerados de nanopartículas como discutido anteriormente, foi realizado um mapeamento por EDS para os elementos ouro

(FIGURA 13-A), carbono (FIGURA 13-B) e ferro (FIGURA 13-C), e na FIGURA 13-D a sobreposição da imagem por SEM e o mapeamento elementar dos três elementos sobrepostos.

FIGURA 13 – IMAGEM DE SEM COM DISTRIBUIÇÃO ELEMENTAR DE (A) OURO, (B) CARBONO E (C) FERRO E (D) A SOBREPOSIÇÃO DOS 3 MAPEAMENTOS SOBRE IMAGEM DE SEM-SE



FONTE: A autora (2021).

De maneira geral o material apresentou uma distribuição elementar homogênea, ressaltando-se, a partir da FIGURA 13-A, a presença de ouro em diferentes pontos do material, com maior concentração do elemento em certos acúmulos de nanopartículas regionais. Na FIGURA 13-B observa-se a distribuição relativamente uniforme de átomos de carbono, enquanto na FIGURA 13-C observa-se uma maior concentração de Fe em determinadas regiões, o que poderia indicar uma maior exposição da malha naquele local, indicando uma não uniformidade na formação do filme polimérico sobre o material de suporte.

Os resultados de caracterização demonstram o sucesso na síntese eletroquímica do PEDOT e na incorporação de nanopartículas de ouro, observadas pela mudança do comportamento eletroquímico do material, e comprovadas pelas técnicas de imageamento e espectroscópicas. A partir de então o eletrodo de malha de aço modificado com PEDOT:PSS-AuNP foi usado como suporte nas etapas envolvendo sua funcionalização e biofuncionalização.

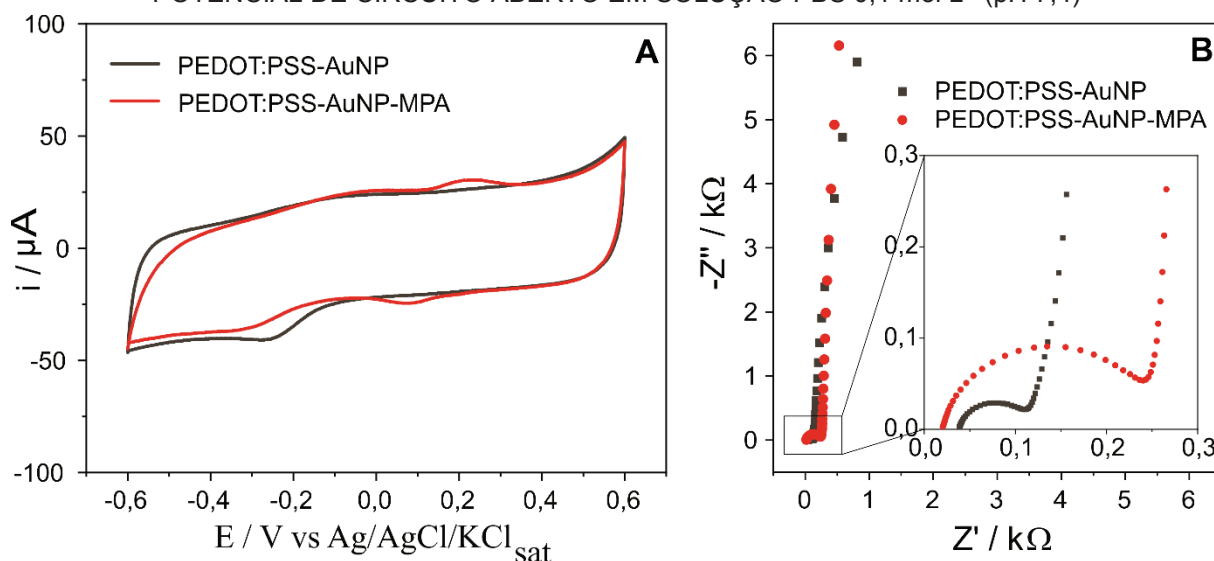
5.3 UTILIZAÇÃO DO PEDOT:PSS-AUNP PARA CONSTRUÇÃO DOS BIOSSENSORES

5.3.1 UTILIZAÇÃO DE SISTEMA MODELO: SISTEMA BIOTINA-AVIDINA

O sistema biotina-avidina tem sido altamente explorado nas últimas décadas devido à alta afinidade apresentada entre as duas moléculas, possibilitando sua utilização em sistemas bioanalíticos, farmacêuticos, e inúmeros eventos bioquímicos. A avidina é composta por quatro subunidades semelhantes, onde cada uma interage com uma molécula de biotina, resultando em constante de afinidade próxima à 10^{15} M^{-1} , o que torna sua interação bastante estável, apesar de não ser formada ligação química covalente entre as estruturas (WILCHEK; BAYER, 1988; WILCHEK; BAYER; LIVNAH, 2006). A interação entre a biotina e a avidina é menos afetada em pHs extremos, na presença de sal e entre outros agentes químicos, por conta de sua alta estabilidade, o que permite sua utilização em diferentes meios e aumenta a versatilidade de aplicação deste sistema (SMITH; MILEA; NGUYEN, 2006).

Neste trabalho, o sistema avidina-biotina serviu como modelo para exploração do potencial da plataforma PEDOT:PSS-AuNP, anteriormente caracterizada para uso em biossensores. Como estratégia, foi formada uma monocamada auto-organizada de alcanotiol (neste caso o ácido mercaptopropiônico – MPA) sobre as nanopartículas de ouro (CAMPUZANO et al., 2002). Na FIGURA 14 estão dispostos os voltamogramas cíclicos (FIGURA 14-A) e os espectros de impedância (FIGURA 14-B) gerados a partir da caracterização do eletrodo de PEDOT:PSS-AuNP antes e após a etapa de funcionalização realizada em MPA 1 mmol L^{-1} por 12 h.

FIGURA 14 – (A) VOLTAMOGRAMAS REALIZADOS EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4), SOB VELOCIDADE DE VARREDURA 20 mV s⁻¹ PARA PEDOT:PSS-Au E PEDOT:PSS-AU-MPA E RESPECTIVOS (B) DIAGRAMA DE NYQUIST DOS ELETRODOS MODIFICADOS OBTIDOS EM POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4)



FONTE: A autora (2021).

Foram testados dois solventes para a formação das SAMs sobre os eletrodos modificados construídos, etanol e água. Usualmente, por conta do caráter mais hidrofóbico da cadeia carbônica interna dos alcanotióis (formada por hidrocarbonetos), as SAMs são formadas a partir da imersão do substrato em solução alcoólica (LOVE et al., 2005). Porém, neste trabalho, a solução aquosa foi selecionada já que o PEDOT:PSS apresenta solubilidade em etanol significativa, podendo acarretar a exposição do eletrodo a esse solvente e causar perda do material depositado na malha (WEN; XU, 2017).

Os voltamogramas (FIGURA 14-A) apresentaram comportamentos diferentes com a introdução da SAM, sendo possível observar um deslocamento nos processos de oxidação e redução do polímero em potenciais próximos de -0,26 V e -0,33 V, antes e após a funcionalização respectivamente. Os processos de oxidação e redução do polímero tornaram-se também menos definidos, o que indicaria maior dificuldade da ocorrência dos processos de transferência de carga no interior do material eletroativo (DU; WANG, 2003).

O comportamento da CV corrobora com o desempenho observado por EIS (FIGURA 14-B), em que após a funcionalização via MPA foi observado um aumento no R_{CT} de 89,6 Ω para 240 Ω . O R_{CT} do material relaciona-se diretamente com uma possível modificação na interface polímero/solução, coerente com a formação de um

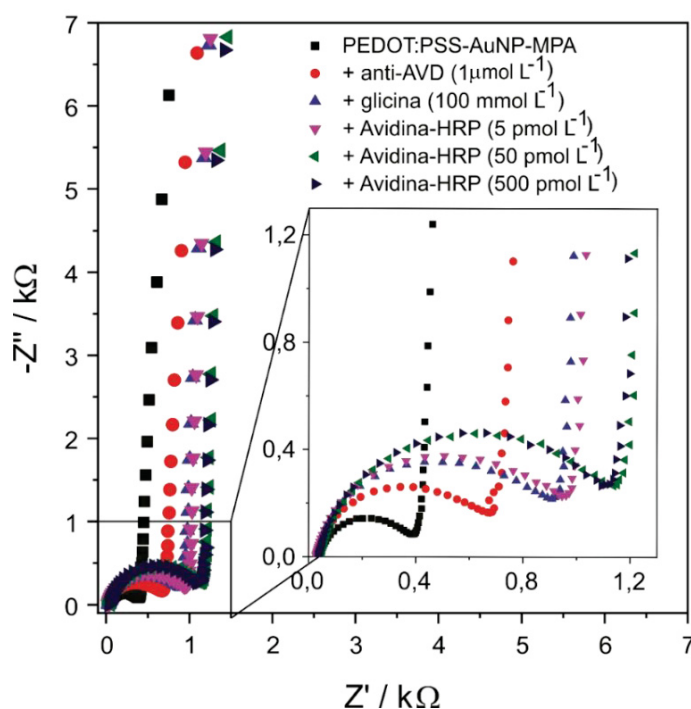
filme de MPA de caráter isolante sobre a superfície, dificultando o processo de transferência de carga no processo faradáico do material (GUAN; MIAO; ZHANG, 2004).

Foi possível observar também o aparecimento de novos processos de oxidação e redução em potenciais próximos de 0,25 V e 0,1 V (FIGURA 14-A), respectivamente, porém não foi possível confirmar se os mesmos são referentes ao MPA ou se a ligação do MPA poderia ter ocasionado alguma alteração estrutural do próprio material polimérico. Para os outros parâmetros de capacitância em médias e baixas frequências não foram observadas mudanças significativas. Elucidada a etapa de funcionalização por SAM de MPA, a plataforma em estudo (PEDOT:PSS-AU-MPA) foi aplicada para imobilização de diferentes bioreceptores e construídos os imunossensores impedimétricos.

O primeiro biossensor construído neste trabalho foi baseado no sistema avidina - biotina, de maneira a avaliar a eficiência da metodologia proposta como uma prova de um conceito. O bioreceptor constitui-se de um anticorpo biotinilado, ou seja, o anticorpo foi conjugado com diversas moléculas de biotina via acoplamento por EDC:NHS. Para minimizar possíveis ligações inespecíficas, geralmente é utilizada uma etapa de bloqueio. No presente trabalho foi escolhida a glicina (ácido 2-aminoacético), um aminoácido de cadeia pequena, a fim de evitar possíveis impedimentos estéricos na etapa de detecção (SERRA, 2011). Finalizada a construção do biossensor, o mesmo foi utilizado para detecção da espécie de interesse, que neste caso é a glicoproteína avidina conjugada a enzima peroxidase (HRP).

Para elucidação da construção do sensor eletroquímico, foi realizada a caracterização de cada etapa envolvida no processo de construção do biossensor de ordem de imobilização discutida acima, para detecção de avidina-HRP por EIS, onde os diagramas de Nyquist para cada etapa estão dispostos na FIGURA 15, com seus respectivos parâmetros eletroquímicos obtidos via circuito equivalente (mesmo circuito equivalente demonstrado na FIGURA 11-B) apresentados na TABELA 2. A partir dos resultados apresentados na TABELA 2 foi possível constatar aumento no valor de R_{CT} em cada uma das etapas utilizadas na construção do eletrodo a partir da etapa de funcionalização.

FIGURA 15 – DIAGRAMAS DE NYQUIST OBTIDOS EM POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) PARA CADA ETAPA NA CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR BASEADO NA INTERAÇÃO ENTRE AVIDINA E BIOTINA, ONDE AS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS DE BIOTINA E GLICINA FORAM DE 1 µmol L⁻¹ e 100 mmol L⁻¹ RESPECTIVAMENTE



FONTE: A autora (2021).

TABELA 2 – PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS CALCULADOS A PARTIR DE DADOS DE EIS OBTIDOS EM CADA ETAPA ENVOLVIDA NA CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR PARA DETECÇÃO DA INTERAÇÃO AVIDINA-BIOTINA

MODIFICAÇÃO	R_s / kΩ	Q_{dl} / $10^{-5} F s^{n-1}$	n_{dl}	R_{ct} / kΩ	$\frac{Q_{lf}}{s^{n-1}} / 10^{-3} F$	n_{lf}
PEDOT:PSS-AuNP-MPA	0,040	2,58	0,83	0,380	1,22	0,97
+Biotina	0,030	2,11	0,86	0,682	1,10	0,96
+Glicina	0,028	1,99	0,86	0,931	1,09	0,97
[AVI] = 5 pmol L ⁻¹	0,028	1,96	0,86	0,980	1,09	0,97
[AVI] = 50 pmol L ⁻¹	0,046	2,02	0,86	1,17	1,08	0,97
[AVI] = 500 pmol L ⁻¹	0,033	2,23	0,85	1,17	1,11	0,98

FONTE: A autora (2021).

A imobilização do anticorpo biotilado anti-avidina foi evidenciado a partir de um aumento no R_{CT} de 302 Ω, já que a macromolécula imobilizada apresenta características isolantes que quando ligada covalentemente ao sensor dificulta o fluxo de elétrons na interface da estrutura polimérica e solução eletrolítica. O mesmo ocorre a partir da etapa de bloqueio realizada com a glicina, que mesmo apresentando estrutura pequena, conferiu ao sistema um aumento de 249 Ω para o mesmo

parâmetro. Então, foram testadas em concentrações baixas de avidina-HPR a resposta do sistema estudado, onde para concentrações de 5 pmol L^{-1} foi possível já observar um aumento no valor de R_{CT} de 49Ω , o que indicaria uma possível interação do analito com o sensor, conferindo excelente detectabilidade da metodologia testada. Em seguida, foram testadas duas concentrações maiores que a primeira, no mesmo eletrodo, sendo observado para a concentração 50 pmol L^{-1} um aumento considerável no valor do R_{CT} de 190Ω . Porém, quando utilizado novamente o eletrodo para concentrações maiores não foi observado nenhum incremento significativo, o que poderia indicar uma saturação da superfície ativa do material, assim não possibilitando nova interação. Os outros parâmetros eletroquímicos (Q_{dl} , Q_{lf}) não apresentaram variações significativas, e para R_s as mudanças podem ser atribuídas a pequenas variações na constante da célula em cada medida.

A partir dos dados apresentados anteriormente explorando a afinidade entre biotina-avidina, observa-se a possibilidade de utilização da metodologia proposta neste trabalho para obtenção de resultados analíticos, apresentando boa relação com os parâmetros eletroquímicos previamente destacados. Dessa maneira, aplicou-se essa metodologia para a construção de um imunossensor para COVID-19.

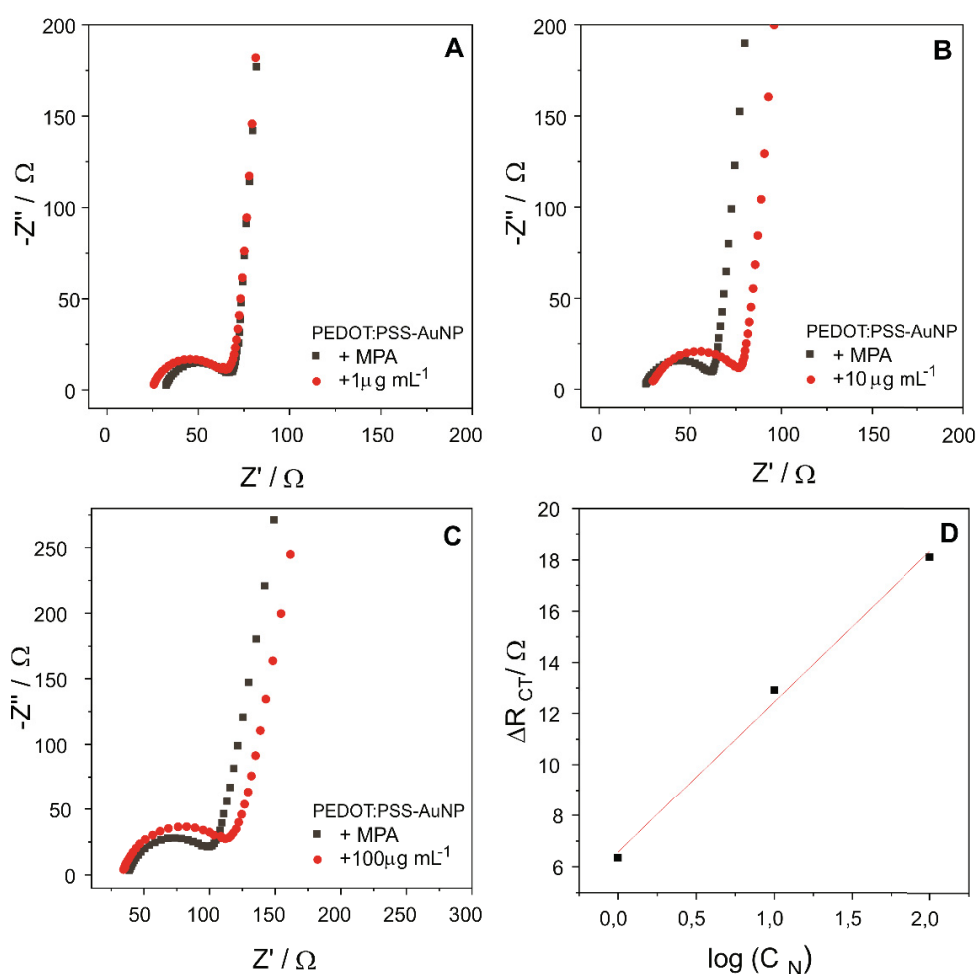
5.3.2 APLICAÇÃO DA PLATAFORMA EM SISTEMA DE ALTA RELEVÂNCIA: COVID-19

A maior dificuldade no desenvolvimento de testes sorológicos é a reação cruzada do antígeno selecionado com outros anticorpos de doenças normalmente similares, podendo gerar falsos positivos, além de possível falta de sensibilidade, ocasionando falsos negativos (FILIZTEKIN; OZKAYA, 2021). Porém, tais testes apresentam como vantagens a segurança da amostragem, seu preparo, transporte, tempo de armazenamento e o analito normalmente encontra-se mais homogeneamente distribuído na amostra. Nesta etapa do trabalho, objetivou-se o desenvolvimento de biossensor de resposta relativamente rápida e sensível para a doença, utilizando a proteína N como bioreceptor.

Primeiramente foram avaliadas por EIS três diferentes concentrações 1, 10 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ da proteína N, estimadas em concentração molar de 0,195, 1,95 e $19,5 \text{ nmol L}^{-1}$, respectivamente, na etapa de ancoramento da unidade de reconhecimento. Seus correspondentes diagramas de Nyquist estão dispostos na FIGURA 16 (A, B e

C, respectivamente), a partir dos quais os parâmetros eletroquímicos foram calculados (TABELA 3) utilizando o mesmo circuito equivalente apresentado na FIGURA 11-B. Na FIGURA 16-D está apresentada a relação linear entre a concentração da proteína N ancorada na superfície do eletrodo e a variação no R_{CT} encontrado via EIS para cada uma das concentrações, em diferentes eletrodos.

FIGURA 16 – DIAGRAMAS DE NYQUIST OBTIDOS EM POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) PARA O ELETRODO MODIFICADO PEDOT:PSS-AuNP PARA AVALIAÇÃO DA ETAPA DE IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA N EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, (A) 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (B) 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ E (C) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. (D) RELAÇÃO LINEAR OBSERVADA PARA A ETAPA DE ANCORAMENTO DA UNIDADE DE RECONHECIMENTO BIOLÓGICO FRENTE AO PARÂMETRO R_{CT}



FONTE: A autora (2021).

Os dados dispostos na TABELA 3 apresentaram diferenças nos parâmetros eletroquímicos iniciais para cada eletrodo construído previamente à imobilização, que pode estar relacionada com possíveis disparidades no material de suporte (malha de aço), temperatura de análise e tamanho do eletrodo. Para contornar esse problema,

foi utilizada a diferença entre o valor do R_{CT} antes e após a modificação, chamado esse parâmetro de ΔR_{CT} .

TABELA 3 – PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS CALCULADOS A PARTIR DA MODELAGEM DOS DADOS DE EIS PARA COMPARAÇÃO DE RESPOSTA PARA AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO BIORECEPTOR

MODIFICAÇÃO	R_s / Ω	$Q_{dl} / 10^{-5} F s^{n-1}$	n_{dl}	R_{ct} / Ω	$Q_{lf} / 10^{-3} F s^{n-1}$	n_{lf}
N (1 $\mu g mL^{-1}$)						
PEDOT:PSS-AuNP-MPA	31	3,97	0,81	40	0,94	0,95
+N(1 $\mu g mL^{-1}$)	24	3,91	0,80	47	0,89	0,96
N (10 $\mu g mL^{-1}$)						
PEDOT:PSS-AuNP-MPA	25	2,95	0,84	40	0,89	0,94
+N(10 $\mu g mL^{-1}$)	28	2,69	0,83	53	0,84	0,95
N (100 $\mu g mL^{-1}$)						
PEDOT:PSS-AuNP-MPA	38	3,14	0,83	74	0,64	0,92
+N(100 $\mu g mL^{-1}$)	24	2,60	0,84	92	0,59	0,91

FONTE: A autora (2021).

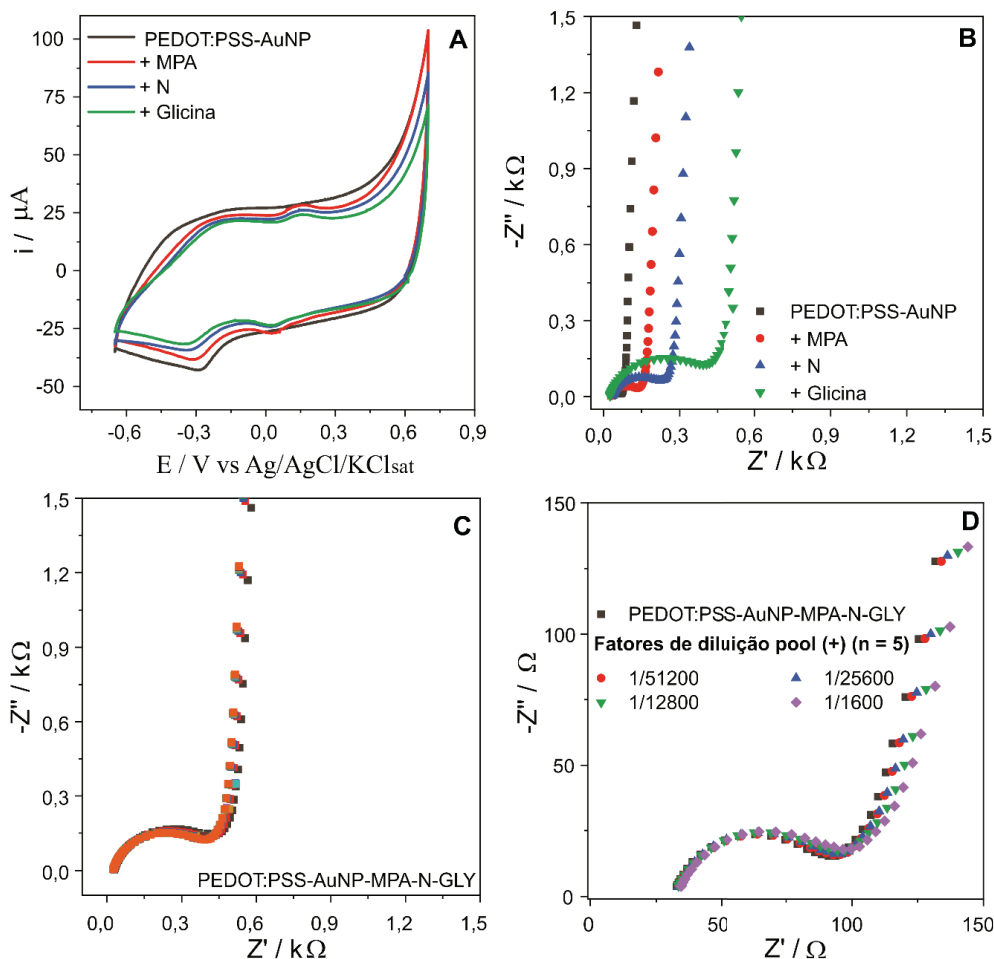
De maneira geral, a resposta do sistema apresentou linearidade para a imobilização da proteína N via formação de SAM onde o coeficiente de determinação R^2 apresentou valor de 0,9906. A partir dos dados apresentados foi possível observar que a quantidade de moléculas do biorreceptor ancoradas na superfície do sensor é proporcional à concentração da proteína N utilizada na etapa de imobilização. Nas etapas seguintes, optou-se por utilizar uma concentração de proteína N de 15 $\mu g mL^{-1}$, uma vez que para a concentração de 10 $\mu g mL^{-1}$ já foi obtida uma variação mais significativa do parâmetro R_{CT} , além desta ser a concentração já previamente utilizada na caracterização via SPR.

Foi então realizada uma caracterização por EIS e CV para cada etapa envolvida no processo de construção do biossensor para COVID-19. A etapa de detecção do imunossensor impedimétrico foi avaliada perante diferentes diluições de soros sanguíneos humanos convalescentes. Como unidade de reconhecimento, foi selecionada a proteína N, imobilizando-a a partir da imersão do eletrodo previamente funcionalizado com MPA e ativado em solução de EDC:NHS, sob mesma metodologia adotada na seção 5.1, em solução preparada em PBS da proteína. Na FIGURA 17 é possível observar a caracterização obtida por CV (FIGURA 17-A) e EIS (FIGURA 17-B) até a etapa da glicina. A estabilidade do sensor construído também foi avaliada, fazendo medidas sucessivas em PBS após a etapa de bloqueio, com diagramas de Nyquist dispostos na FIGURA 17-C. As medidas sucessivas do eletrodo nessa etapa

apresentaram desvio padrão de $13,0 \, \Omega$ para as medidas de R_{ct} (RSD = 2,94%). Finalmente, o imunossensor foi exposto a diferentes fatores de diluição de um pool contendo 5 amostras diferentes de soros convalescentes positivos, e os seus respectivos diagramas de Nyquist estão apresentados na FIGURA 17-D.

A partir dos dados de EIS foram calculados os parâmetros eletroquímicos considerando o mesmo circuito equivalente de Randles modificado discutido anteriormente na FIGURA 11-B, e estão disponibilizados na TABELA 4.

FIGURA 17 – (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR PARA COVID-19, REALIZADOS EM SOLUÇÃO PBS EM VELOCIDADE DE VARREDURA $20 \, \text{mV s}^{-1}$ (B) DIAGRAMAS DE NYQUIST OBTIDOS DAS MESMAS ETAPAS EM POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO EM SOLUÇÃO PBS $0,1 \, \text{mol L}^{-1}$ (pH 7,4). (C) MEDIDAS SUCESSIVAS DO BIOSSENSOR EM SOLUÇÃO PBS PARA AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE. (D) EXPOSIÇÃO DO BIOSSENSOR A DIFERENTES FATORES DE DILUIÇÃO DE SOROS CONVALESCENTES POSITIVOS PARA COVID-19



FONTE: A autora (2021).

TABELA 4 – PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS CALCULADOS A PARTIR DA MODELAGEM DOS DADOS DE EIS PARA CADA ETAPA ENVOLVIDA NA CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR BASEADO EM PEDOT:PSS-AuNP PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA COVID-19

MODIFICAÇÃO	R_s / Ω	$Q_{dl} / 10^{-5} F s^{n-1}$	n_{dl}	R_{ct} / Ω	$Q_{lf} / 10^{-3} F s^{n-1} n_{lf}$	
PEDOT:PSS-AuNP	30	1,49	0,66	49,2	1,22	0,97
+MPA	28	6,68	0,75	132,8	1,16	0,95
+N(15 $\mu g mL^{-1}$)	33	5,32	0,75	234,1	1,08	0,94
+Glicina (100 $mmol L^{-1}$)	24	3,86	0,79	441,6	0,99	0,92

FONTE: A autora (2021).

Observando os resultados apresentados é possível verificar um comportamento concordante com a VC e EIS. Nos voltamogramas apresentados (FIGURA 17-A) foi possível observar uma diminuição da corrente total do sistema, a partir da associação de novas moléculas isolantes na interface do biossensor, justificado pela dificuldade de difusão das espécies eletroativas no material modificado.

Os resultados apresentados na TABELA 4 são similares quando comparados ao biossensor para avidina-biotina, já que cada estágio de sua construção foi distinguido pelas mudanças nos parâmetros eletroquímicos da plataforma. De maneira geral, foi possível observar uma diminuição nos parâmetros Q_{dl} (com exceção da etapa de funcionalização, onde houve um aumento considerável) e um aumento do R_{ct} , comportamento esse correspondente com os outros sistemas testados ao longo deste trabalho, o que indicaria a possível aplicação do dispositivo construído como biossensor para detecção de anticorpos para a COVID-19. Porém, na etapa de detecção, a variação para cada diluição se assimilou ao valor do desvio do próprio biossensor, o que não indicaria uma mudança significativa na interface eletroquímica pelos anticorpos presentes na amostra. Por este motivo, observou-se que o eletrodo modificado de PEDOT:PSS-AuNP funcionalizado com SAM de MPA para ancoramento da proteína N, não apresentou resultados satisfatórios até o momento.

Constata-se a necessidade de otimização ao longo da construção da plataforma, pois observou-se no decorrer dos experimentos uma baixa sensibilidade e dificuldades principalmente na reprodução da síntese de PEDOT:PSS-AuNP, e na etapa de funcionalização a partir da formação da monocamada de MPA, afetando a obtenção de resultados em réplicas. Para contornar tais obstáculos, foram testadas diferentes cargas de deposição para o polímero e nanopartículas de ouro, além de testadas diferentes SAMs como cisteamina e SAMs mistas de MUA e MPA, porém

não foi possível obter respostas satisfatórias para o sistema em estudo. Fato este que não impossibilitou o emprego dessa plataforma para outras aplicações. Em um estudo realizado paralelamente, uma morfologia nanoestruturada do PEDOT foi empregada para ancoramento da proteína recombinante de reconhecimento ao folato para construção de um biossensor seletivo para ácido fólico (biomarcador de câncer).

Todavia, como o foco do presente trabalho é o desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico como nova metodologia de diagnóstico sorológico da COVID-19, optou-se por manter a malha de aço como suporte e testar outro polímero condutor, o polipirrol, com o objetivo de contornar as dificuldades encontradas anteriormente, principalmente no que se refere à reprodutibilidade na etapa de síntese do eletrodo.

5.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS MODIFICADOS DE PPY:PSS-AUNP

Constatada as dificuldades enunciadas na síntese do eletrodo modificado de PEDOT, foi proposta a utilização de polipirrol para a modificação do eletrodo de malha de aço. O polipirrol, polímero condutor bastante utilizado em biossensores, apresenta boa estabilidade, facilidade na síntese e eletroatividade em tampão PBS, não sendo necessária então a presença de uma sonda eletroquímica em suas análises, assim como o PEDOT.

Inicialmente, diferentes metodologias de formação do filme polimérico foram testadas, já que diferentemente do EDOT, o pirrol permite sua dispersão em água, não sendo necessária a presença de PSS, porém, ainda assim, o mesmo pode ser utilizado para compensar a carga positiva do polímero (HRYNIEWICZ et al., 2019). Por isso, as diferentes soluções eletrolíticas de síntese testadas foram KNO_3 em pH 2,0, ácido p-toluenossulfônico e dodecil benzeno sulfato de sódio, e NaPSS, sendo que com o PSS o mesmo apresentou estabilidade superior pós síntese, sendo esta blenda polimérica novamente utilizada.

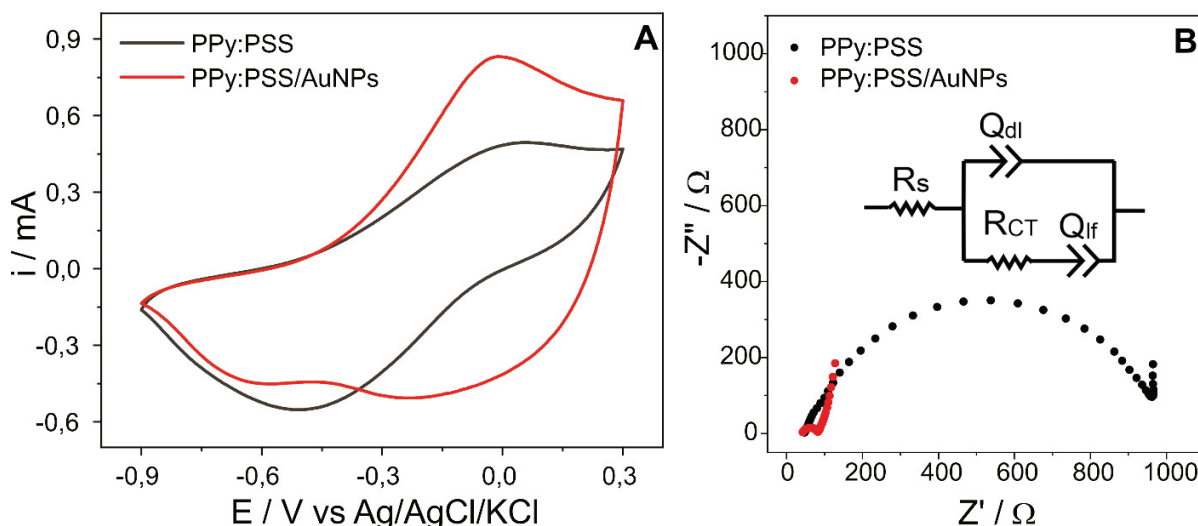
Vale ressaltar que nessa etapa do trabalho algumas condições experimentais para a construção do biossensor foram alteradas, uma vez que se objetivou a futura comparação do desempenho analítico desta plataforma com uma de morfologia nano-

estruturada do PPy, trabalho este realizado em parceria com o Grupo de Pesquisa em Macromoléculas e Interfaces (GPMin) da UFPR.

De maneira similar ao observado na seção 5.2 deste trabalho, a síntese dos eletrodos modificados de PPy:PSS-AuNP foi realizada em duas etapas eletroquímicas, uma para a síntese do composto PPy:PSS, e outra para a eletrodeposição das AuNPs. Então, foi caracterizada a construção dos eletrodos em solução tampão fosfato salino (PBS), pH de 7,4, como eletrólito, empregando as técnicas de EIS, CV, SEM e EDS (TEHRANI et al., 2007).

Na FIGURA 18 estão apresentados os voltamogramas cíclicos (FIGURA 18-A) do PPy:PSS obtidos antes e após a incorporação das AuNPs e seus respectivos diagramas de Nyquist e circuito equivalente correspondente (FIGURA 18-B), utilizado para cálculo dos parâmetros eletroquímicos (valores inseridos na TABELA 5). Foi possível caracterizar eletroquimicamente a síntese realizada a partir da mudança das propriedades analisadas, tanto por CV quanto por EIS, quando incorporada às nanopartículas.

FIGURA 18 – (A) VOLTAMOGRAMAS REALIZADOS EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4), SOB VELOCIDADE DE VARREDURA 20 mV s⁻¹ PARA PPy:PSS E PPy:PSS-AU E RESPECTIVOS (B) DIAGRAMAS DE NYQUIST REALIZADOS EM POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) E SEU CIRCUITO EQUIVALENTE CORRESPONDENTE



FONTE: A autora (2021).

TABELA 5 – PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS CALCULADOS A PARTIR DA MODELAGEM DOS DADOS DE EIS DO ELETRODO DE PPy:PSS ANTES E APÓS A ELETRODEPOSIÇÃO DAS AuNPs

MODIFICAÇÃO	R_s / Ω	$Q_{dl} / 10^{-5} F s^{n-1}$	n_{dl}	R_{ct} / Ω	$Q_{lf} / 10^{-3} F s^{n-1}$	n_{lf}
PPy:PSS	48,85	6,31	0,82	935,2	20,0	0,99
PPy:PSS-AuNP	40,92	10,06	0,72	44,82	137,2	0,82

FONTE: A autora (2021).

O comportamento voltamétrico do polímero na ausência do ouro exibido na FIGURA 18-A apresentou comportamento eletroativo, com processos de oxidação e redução presentes aproximadamente em 0,05 V e -0,5 V, respectivamente, referentes ao processo redox característico do PPy. Quando incorporada às nanopartículas, foi possível observar um acréscimo no valor da corrente total, provavelmente relacionada com o aumento da área eletroativa do material na presença das AuNPs, além do aparecimento de uma nova onda voltamétrica de redução em -0,68 V. As medidas de EIS reforçaram os comportamentos observados por CV, e o circuito equivalente utilizado apresenta comportamento estabelecido para eletrodos modificados com polímeros condutores, como já discutido anteriormente.

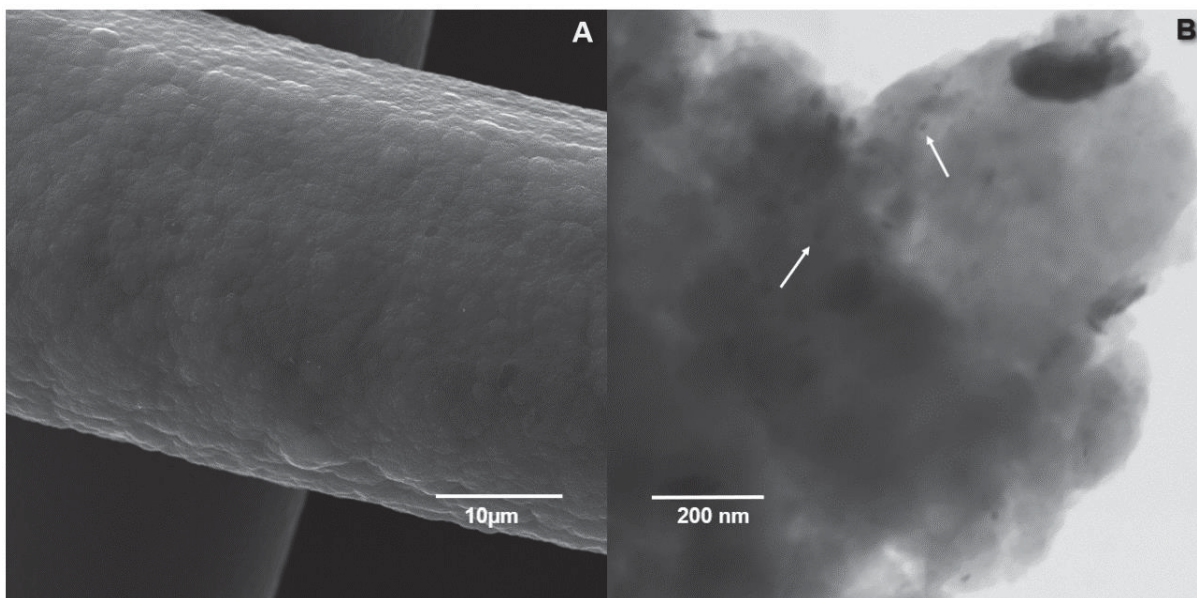
Assim como para o PEDOT, quando incorporada as nanopartículas dois parâmetros interfaciais exibiram mudanças expressivas, R_{CT} e Q_{dl} , ambos indicando o aumento da eletroatividade na interface devido a presença das nanopartículas metálicas, sendo relacionado com a diminuição do R_{CT} , que demonstra um favorecimento dos processos redox do material, e o aumento de Q_{dl} , o qual indica uma maior área eletroativa para PPy:PSS-AuNP. Foi possível também observar uma diminuição no valor de n_{dl} , que pode estar associado com uma maior rugosidade da superfície a partir da adição das nanopartículas. Diferentemente do PEDOT, para o PPy foi observada uma variação expressiva no parâmetro Q_{lf} , indicando uma mudança no processo de intercalação de cargas na matriz polimérica, que com a diminuição no valor de n_{lf} sugere-se uma intercalação menos homogênea ao longo do polímero.

A modificação do eletrodo a partir da adição das nanopartículas foi também evidenciada espectroscopicamente e microscopicamente via medidas de SEM e EDS. Na FIGURA 19-A está disposta a imagem de SEM para PPy:PSS-AuNP, onde a morfologia globular de polímeros condutores eletroquimicamente sintetizados pôde ser observada (CUI et al., 2001). Na FIGURA 19-B observa-se a imagem de STEM, onde existe a presença de pequenos pontos pretos, que correspondem as nanopartículas metálicas, sendo possível estimar a partir da técnica o tamanho médio

destas de 14 nm (medidas pelo software do equipamento). A presença das nanopartículas no material foi também evidenciada a partir da análise química elementar por EDS de uma área do eletrodo (FIGURA 20), sendo observado naquela região uma contribuição em massa atômica aproximada de 20% para o ouro em relação a outros elementos presentes, como carbono, ferro, oxigênio e enxofre. O espectro de EDC apresentou banda referente a transição de átomos de ouro na região de 2,1 keV, relacionada com a transição Au $M\alpha_1$, indicada pelo software do equipamento utilizado (MUBARAKALI et al., 2011).

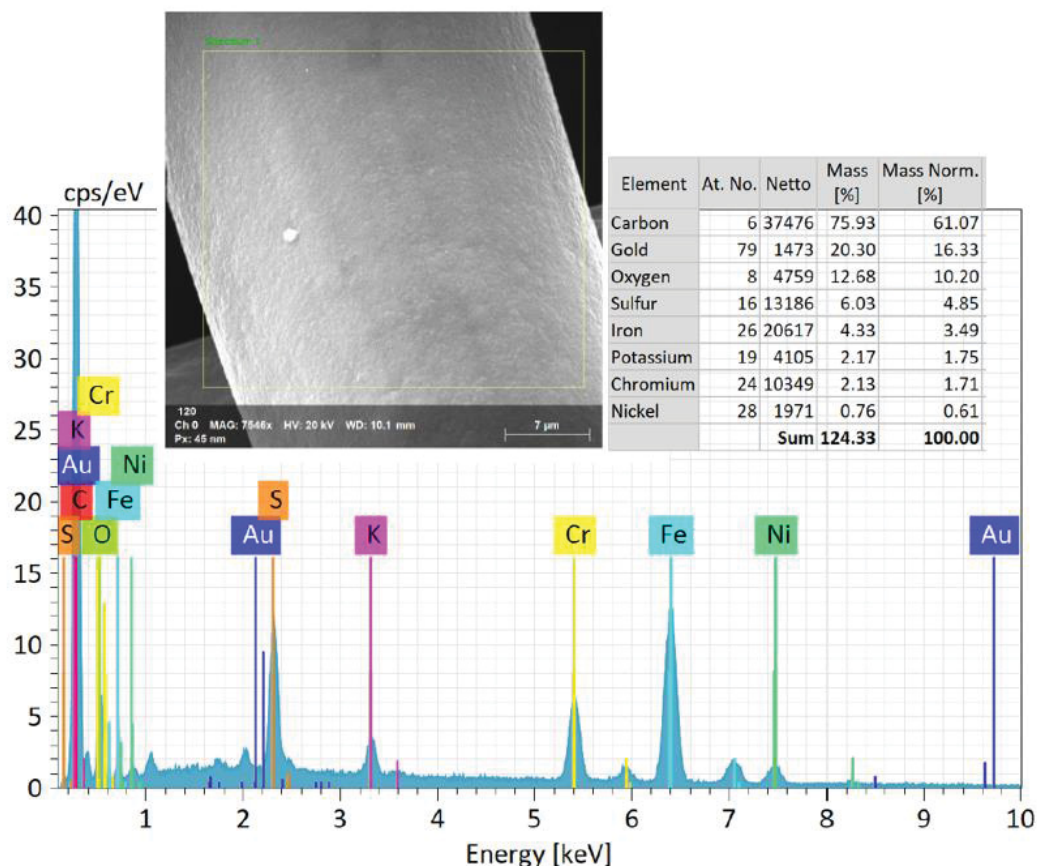
Os dados de caracterização dispostos nas FIGURA 18, FIGURA 19 e FIGURA 20 demonstram o sucesso na incorporação das nanopartículas metálicas (AuNPs) no eletrodo modificado de PPy:PSS, indicando um aprimoramento nas propriedades eletroquímicas do material a partir da adição das AuNPs, e possibilitando a funcionalização das mesmas a partir da adição de uma SAM de MPA para a construção do imunossensor para COVID-19.

FIGURA 19 – IMAGENS REPRESENTATIVAS DE SEM PARA PPy:PSS-AuNP POR (A) ESPALHAMENTO DE ELÉTRONS (SE) E (B) STEM COM DESTAQUE NAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PRESENTES NO MATERIAL



FONTE: A autora (2021).

FIGURA 20 – ANÁLISE ELEMENTAR QUÍMICA PARA UMA FRAÇÃO DA MALHA DE AÇO MODIFICADA COM PPY:PSS-AuNP E SEU RESPECTIVO ESPECTRO DE EDS



FONTE: A autora (2021).

5.5 UTILIZAÇÃO DO PPy:PSS-AUNP PARA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSOR PARA COVID-19

A partir da incorporação das AuNPs na plataforma estudada, foi possível funcionalizar sua superfície a partir do contato do eletrodo com solução aquosa de MPA 1 mmol L^{-1} , para futuro ancoramento covalente da unidade de reconhecimento biológico (proteína N), utilizada nessa etapa em concentração de $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, e futura interação com anticorpos presentes em soros sanguíneos. Nesta etapa do trabalho foi utilizada como etapa de bloqueio o BSA (1%), já que o mesmo apresentou melhores resultados. Cada etapa utilizada para a construção do biossensor foi caracterizada eletroquimicamente via CV e EIS, e espectroscopicamente via Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier-transform infrared spectroscopy*), disponibilizados na FIGURA 21 (A, B e C respectivamente). Os parâmetros eletroquímicos obtidos a partir dos dados de EIS encontram-se expostos

na TABELA 6, calculados a partir do mesmo circuito equivalente apresentado anteriormente (FIGURA 17-B).

FIGURA 21 – (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR PARA COVID-19 EM PPy:PSS-AuNP REALIZADOS EM SOLUÇÃO PBS E VELOCIDADE DE VARREDURA 20 mV s^{-1} . (B) DIAGRAMAS DE NYQUIST OBTIDOS EM POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO EM SOLUÇÃO PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) PARA AS MESMAS ETAPAS ANALISADAS POR CV E SEUS RESPECTIVOS (C) ESPECTROS DE FTIR

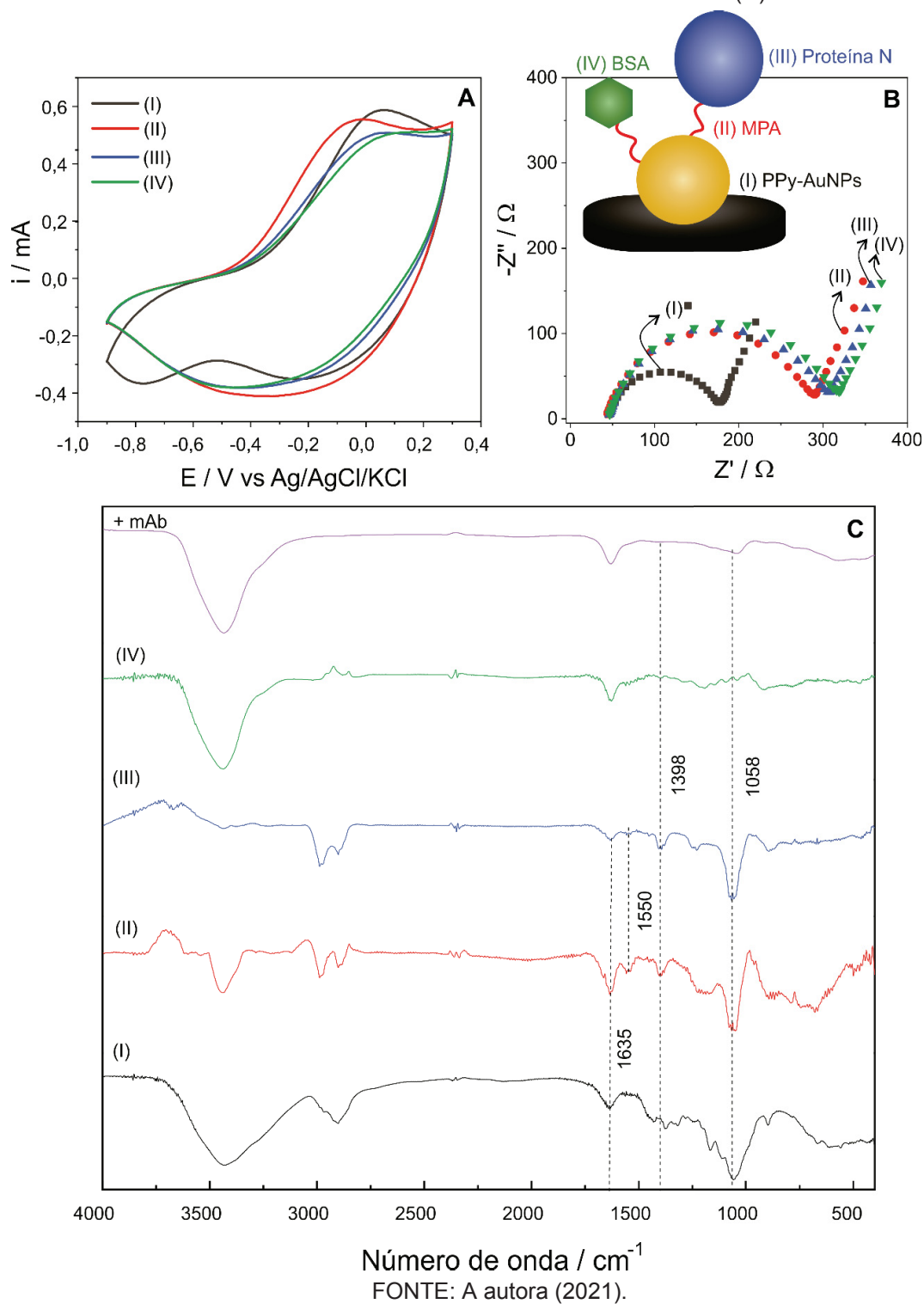


TABELA 6 – PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS CALCULADOS A PARTIR DA MODELAGEM DOS DADOS DE EIS PARA CADA ETAPA ENVOLVIDA NA CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR BASEADO EM PPy:PSS-AuNP PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA COVID-19

MODIFICAÇÃO	R_s / Ω	$Q_{dl} / 10^{-5} F s^{n_{dl}}$	n_{dl}	R_{ct} / Ω	$Q_{lf} / 10^{-3} F s^{n_{lf}}$	n_{lf}
PEDOT:PSS-AuNP	44,51	2,15	0,85	133,7	88,57	0,97
+MPA	42,80	1,97	0,86	247,2	80,16	0,95
+N (1 $\mu g mL^{-1}$)	46,28	1,99	0,86	260,5	80,92	0,94
+BSA (1% - m:V)	44,01	1,86	0,87	271,8	79,25	0,92

FONTE: A autora (2021).

A caracterização por etapa eletroquímica apresentou respostas similares às discutidas anteriormente para biossensores de PEDOT:PSS-AuNP, tanto para o sistema biotina-avidina, quanto para COVID-19, mostrando que a resposta obtida é coerente entre as plataformas estudadas. O comportamento voltamétrico (FIGURA 21-A) apresentou uma diminuição na corrente total observada em cada etapa da construção do sensor, que pode estar relacionada tanto quanto ao aumento da resistência à transferência de carga, quanto aos processos de intercalação de carga do material. O que corrobora com os resultados apresentados pela EIS (FIGURA 21-B), o qual os valores de R_{CT} foram os que apresentaram mudança mais expressiva, comportamento bastante observado em biossensores impedimétricos faradáicos (BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2016), uma vez que ocorre um bloqueio na superfície do eletrodo a partir da inserção das moléculas em cada etapa estudada, que dificulta o processo de transferência de carga na interface eletroquímica entre o eletrodo e o *bulk*. A variação dos parâmetros de R_s , Q_{dl} e Q_{lf} não apresentaram mudanças significativas, podendo variação apresentada estar dentro do erro na modelagem dos parâmetros a partir do circuito equivalente.

Já para a caracterização espectroscópica via FTIR exibida na FIGURA 21-C foi possível observar mudanças no espectro em cada etapa realizada para a construção do imunossensor. Na TABELA 7 estão resumidos os resultados obtidos por FTIR discutidos a seguir. Primeiramente, no espectro para PPy:PSS-AuNP foi observada bandas características para o pirrol, relacionadas vibrações de deformações axiais para C—H e C—N em 3000-3300 cm^{-1} e 1448 cm^{-1} , respectivamente, em 894 cm^{-1} e 673 cm^{-1} para deformação no plano e angular de C—H, respectivamente, em 1058 cm^{-1} relacionada com a deformação angular C—C (JANG; YOON, 2003). Algumas bandas foram também associadas ao PSS, como em

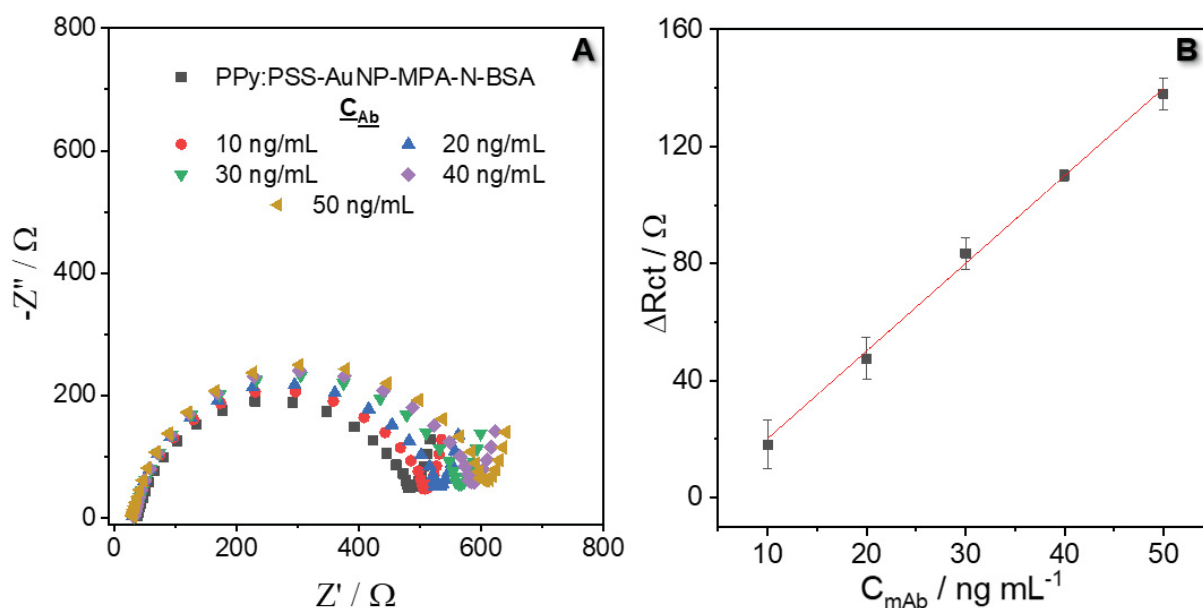
1635 cm^{-1} , que pode ser atribuída a moléculas de água associadas ao PSS devido a ligações de hidrogênio (MARUTHAMUTHU et al., 2017). A partir da associação com o MPA, foi possível observar uma banda em 3450 cm^{-1} relacionada com a vibração COOH, um aumento na banda em 1635 cm^{-1} devido as ligações C=O, e o aparecimento de bandas em 1398 e 1550 cm^{-1} para deformações simétricas e assimétricas de carboxilatos, respectivamente (ITTEBOINA et al., 2018). A banda em 1550 cm^{-1} desaparece após a imobilização da proteína N, o que pode indicar que a imobilização da proteína via EDC:NHS foi eficiente.

TABELA 7 – NÚMERO DE ONDA E SUAS RESPECTIVAS ATRIBUIÇÕES DAS BANDAS OBTIDAS POR FTIR PARA CARACTERIZAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DE BIOSENSOR IMPEDIMÉTRICO

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Referência
3000-3300	Deformação axial C-H	(JANG; YOON, 2003)
1448	Deformação axial C-N	(JANG; YOON, 2003)
894	Deformação angular no plano C-H	(JANG; YOON, 2003)
673	Deformação angular fora do plano C-H	(JANG; YOON, 2003)
1635	Ligações C=O	(MARUTHAMUTHU et al., 2017)
1058	Deformação angular C-C	(MARUTHAMUTHU et al., 2017)
3450	Vibração COOH	(ITTEBOINA et al., 2018)
1398	Deformação simétrica COOH	(ITTEBOINA et al., 2018)
1550	Deformação assimétrica COOH	(ITTEBOINA et al., 2018)

Evidenciada a construção do biossensor a partir de diferentes técnicas de caracterização, foi avaliado o desempenho analítico do imunossensor baseando-se em sua exposição a diferentes concentrações de anticorpo monoclonal (mAb) para SARS-CoV-2 e sua análise via EIS. Os diagramas de Nyquist para a detecção de mAb de 10-50 ng mL^{-1} estão apresentados na FIGURA 22-A, e a relação linear entre a resposta do sensor avaliada a partir da mudança do R_{CT} de acordo com a concentração encontra-se na FIGURA 22-B.

FIGURA 22 – (A) DIAGRAMAS DE NYQUIST OBTIDOS EM POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) DO ELETRODO PPy:PSS-AuNP-MPA-N-BSA PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO ANTICORPO MONOCLONAL (mAb) E (B) RELAÇÃO LINEAR ENTRE ΔR_{CT} E AS CONCENTRAÇÕES DE mAb



FONTE: A autora (2021).

Observou-se que com o aumento da concentração do anticorpo o sensor apresentou mudanças no valor da resistência à transferência de carga, evidenciado pelo aumento no diâmetro do semi-círculo presente na região de maior frequência, devido a sua interação com a unidade de reconhecimento previamente imobilizada sobre a superfície do eletrodo, o que dificulta a transferência de carga na interface do eletrodo. A curva analítica presente na FIGURA 22-B apresentou $R^2=0,997$, exibindo boa relação linear. A partir dos dados obtidos foi possível calcular o limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) a partir das equações (2) e (3) apresentadas a seguir, onde SD representa o desvio-padrão para 10 medidas de branco (nesse caso selecionado medidas do biossensor até a etapa de bloqueio, anterior a exposição as concentrações de anticorpo), e o coeficiente angular da reta (m).

$$LOD = \frac{3,3 \times SD}{m} \quad (2) \quad LOQ = \frac{10 \times SD}{m} \quad (3)$$

A plataforma avaliada apresentou boa sensibilidade, apresentando valores de LOD e LOQ de 2,87 e 8,74 ng mL⁻¹, respectivamente. Considerando uma estimativa de massa molecular de anticorpos IgG de 150 kDa (150 x 10³ g mol⁻¹), os valores de LOQ e LOD em concentração molar correspondem a 19,1 e 58,3 pmol L⁻¹ (JANEWAY et al., 2001). Este resultado evidencia que a metodologia adotada para imobilização

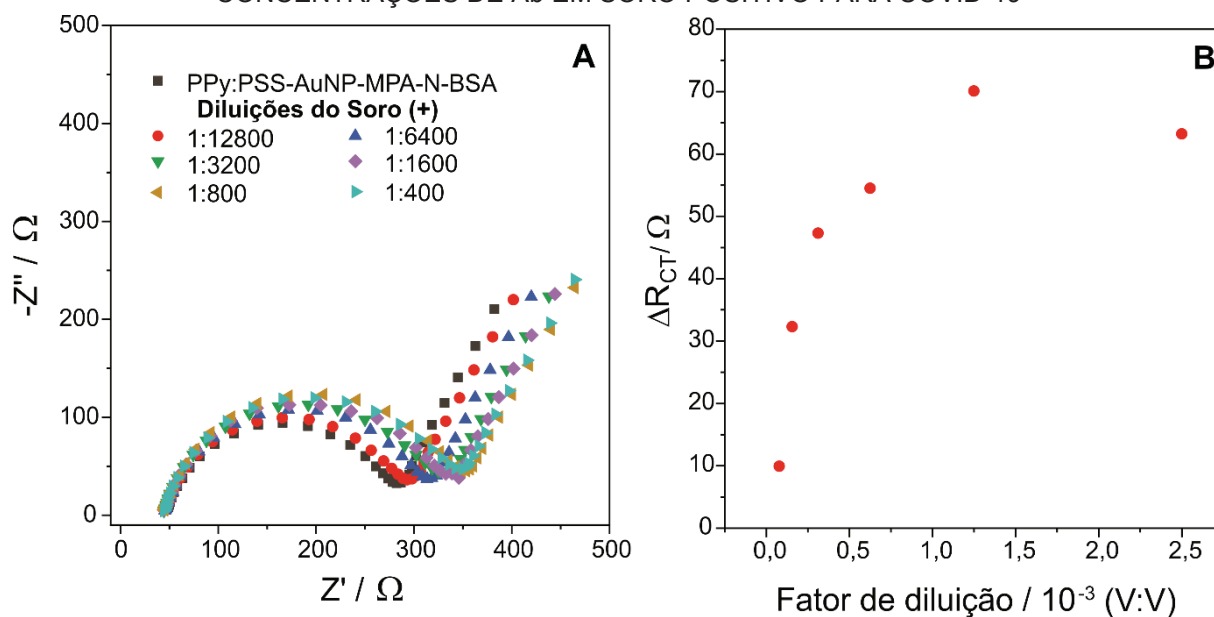
da proteína N foi bem-sucedida, proteína esta que já demonstrou em resultados presentes na literatura uma melhor sensibilidade quando comparada com a proteína S, apesar desta última ter apresentado melhores valores de seletividade (FABIANI et al., 2021; LIU; RUSLING, 2021; PISANIC et al., 2021).

A resposta do biossensor construído baseado em eletrodo modificado de PPy:PSS-AuNPs foi também avaliada perante soros positivos para COVID-19, para observação de sua resposta em amostras reais. Na FIGURA 23 estão representados os diagramas de Nyquist (FIGURA 23-A) para detecção de anticorpos presentes em amostra de soro convalescente positivo para COVID-19 (expostos em soro diluído seriamente de 1:400 a 1:12800 / V:V), e a relação entre a variação do R_{CT} antes e após a introdução do eletrodo ao soro (ΔR_{CT}) e o fatores de diluição do soro (FIGURA 23-B).

A exposição do eletrodo preparado às soluções diluídas do soro positivo para COVID-19 a plataforma apresentou resposta esperada, similar à resposta do dispositivo quando exposto a mAb, resultado este ilustrado pelo aumento no diâmetro do semicírculo na FIGURA 23-A, em altas frequências, relacionado com o aumento da concentração de anticorpos presentes no meio, como já discutido em resultados anteriores. Foi possível observar através do gráfico da FIGURA 23-B, inicialmente, em fatores de diluição mais baixos, uma alta variação do R_{CT} . Porém à medida que a concentração do soro na solução foi aumentando, a taxa de aumento correspondente de ΔR_{CT} diminuiu, possivelmente por conta de uma saturação dos sítios ativos disponíveis para a reação com a anticorpo.

Outros trabalhos utilizando imunossensores impedimétricos como dispositivos para detecção da infecção da COVID-19 foram reportados na literatura (AYDIN; AYDIN; SEZGINTÜRK, 2021; RASHED et al., 2021). Aydin et. al. desenvolveram um dispositivo a partir da inserção de nanopartículas de ouro em eletrodo de ITO (óxido de estanho dopado com índio), e imobilizando a unidade de reconhecimento via ligação covalente, o domínio receptor-obrigatório (RBD) da proteína S, a partir da funcionalização das nanopartículas com SAM de MUA. As medidas de EIS foram realizadas em sonda Fe^{+2}/Fe^{+3} , apresentando LOD de $0,577 \text{ fg mL}^{-1}$. Já Rashed e colaboradores desenvolveram uma plataforma rápida para detecção de anticorpos via EIS a partir da unidade de reconhecimento RBD, porém os mesmos não determinaram LOD e LOQ para a plataforma construída.

FIGURA 23 – (A) DIAGRAMAS DE NYQUIST OBTIDOS EM POTENCIAL DE CIRCUITO ABERTO EM SOLUÇÃO PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) DO ELETRODO PPy:PSS-AuNP-MPA-N-BSA PARA DIFERENTES FATORES DE DILUIÇÃO DE SORO POSITIVO E (B) RELAÇÃO ENTRE ΔR_{CT} E AS CONCENTRAÇÕES DE Ab EM SORO POSITIVO PARA COVID-19



FONTE: A autora (2021).

A metodologia apresentada neste trabalho tem como vantagens uma boa sensibilidade, permite a detecção de anticorpos em PBS, ou seja, sem a necessidade de introduzir uma sonda eletroquímica, utilizando uma pequena quantidade de bioreceptor e empregando eletrodo construído a partir da malha de aço. Ou seja, trata-se de um imunossensor descartável que permite análise de baixo custo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o reportado, os resultados apresentados são motivadores, evidenciando a viabilidade da plataforma proposta para construção de um novo método sorológico de detecção de anticorpos presentes em soros de pacientes positivos para a COVID-19. Espera-se que a partir dessa pesquisa fundamental o método venha a ser validado, não excluindo as possibilidades de seu aprimoramento, e desempenhe um papel fundamental no que diz respeito à utilização de biossensores eletroquímicos em problemas de saúde pública de elevado impacto na sociedade.

Destaca-se a fabricação a partir de síntese eletroquímica de eletrodos modificados utilizando diferentes polímeros condutores (PPy e PEDOT) dopados com PSS, e decorados com AuNPs, de tamanho médio de nanopartícula estimado de 14 nm, e sua caracterização via diferentes técnicas eletroquímicas, espectroscópicas e microscópicas, sobre malha de aço. Ambos os materiais apresentaram resultados promissores quando avaliados para aplicação em biossensoriamento, sendo possível a caracterização de cada etapa necessária para a construção da plataforma a partir de metodologia proposta via EIS, CV e FTIR. Porém, destaca-se que para a COVID-19 o PPy:PSS-AuNP apresentou resultados mais sensíveis, utilizando a proteína N do SARS-CoV-2 como unidade de reconhecimento. Obteve-se para tal plataforma parâmetros analíticos LOD e LOQ de 19,1 e 58,3 pmol L⁻¹ respectivamente, além de ter sido detectada a presença de anticorpos em amostras reais em fator de diluição 1:12800.

A metodologia proposta destaca-se devido ao baixo custo do material utilizado como suporte (malha de aço), o que diminuiria o custo final por análise, além de não ser necessária a utilização de sondas eletroquímicas, como solução de K₃Fe(CN)₆, uma vez que os polímeros sintetizados PPy e PEDOT apresentam eletroatividade em PBS. Além disso, foi necessária uma quantidade pequena do bioreceptor para o funcionamento do dispositivo, não afetando a sensibilidade do sistema, que ainda assim foi capaz de detectar concentrações baixas do anticorpo, característica importante para evitar resultados falso-negativos.

7 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

A proposta por este trabalho apresentou resultados analíticos promissores, quando avaliada sua resposta a diferentes concentrações de anticorpo monoclonal para a proteína N (o bioreceptor selecionado para este dispositivo). Para uma análise mais aplicada da plataforma, destaca-se a necessidade de uma validação analítica.

Uma das principais preocupações na construção de um biossensor é o método de imobilização utilizado para o elemento biológico (KHAN et al., 2020), essencial para diminuir a possibilidade de falhas na detecção do analito. Para ser aplicada em amostras reais, o eletrodo descartável produzido necessita eficientemente separar respostas positivas de negativas, independente da presença de interferentes na amostra, evitando respostas falso positivas, o que é dificultado uma vez que a matriz analítica utilizada é bastante diversa. Essa etapa é altamente relacionada com a orientação da unidade de reconhecimento imobilizada, e poderá ser avaliada em experimentos futuros, conflitando respostas da plataforma a partir de sua exposição a diferentes soros positivos e negativos.

Além do que, é possível avaliar o tempo de funcionalidade do sensor construído, já que é de interesse que o mesmo possua a capacidade de operar por um longo período de tempo, e possibilitar sua aplicação em análises de POC (do inglês *point-of-care*) (KHAN et al., 2020).

Poderia também ser explorada uma otimização, considerando as condições de síntese do material, uma vez que foi observado experimentalmente, no decorrer deste trabalho, que as cargas de deposição do polímero e da nanopartícula de ouro (proporcionais a quantidade de material sintetizado sobre a malha de aço), além da quantidade de dopante (PSS) utilizado no processo de síntese, interferem significativamente na resposta do sensor. Ou seja, realizando uma otimização destas três variáveis seria possível a obtenção de parâmetros analíticos de LOD e LOQ ainda mais baixos.

REFERÊNCIAS

- AQRAWI, Z. et al. The influence of macropores on PEDOT/PSS microelectrode coatings for neuronal recording and stimulation. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 281, p. 549–560, 2019.
- ASADUZZAMAN, M.; HOSSAIN, N.; ABUL, M. Immune response in COVID-19: A review. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 11, p. 1619-1629, 2020.
- AVELINO, K. Y. P. S. et al. Flexible sensor based on conducting polymer and gold nanoparticles for electrochemical screening of HPV families in cervical specimens. **Talanta**, v. 226, p. 122118, 2021.
- AYDIN, E. B.; AYDIN, M.; SEZGINTÜRK, M. K. Highly selective and sensitive sandwich immunosensor platform modified with MUA-capped GNPs for detection of spike Receptor Binding Domain protein: A precious marker of COVID 19 infection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 345, p. 130355, 2021.
- BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. A review on impedimetric biosensors. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 248–262, 2016.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001. p. 864.
- BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry principles, methods, and applications**. New York: Oxford University Press, 1993.
- CAMPUZANO, S. et al. Preparation, characterization and application of alkanethiol self-assembled monolayers modified with tetrathiafulvalene and glucose oxidase at a gold disk electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 526, n. 1–2, p. 92–100, 2002.
- CARVALHO, L. A. et al. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica Aplicada ao estudo das Reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 796–804, 2006.
- CIRAKLI, U.; DOGAN, I.; GOZLU, M. The Relationship Between COVID-19 Cases and COVID-19 Testing: a Panel Data Analysis on OECD Countries. **Journal of the Knowledge Economy**, 2021.
- COOPER, M. A. Label-free screening of bio-molecular interactions. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, n. 5, p. 834–842, 2003.
- CUI, X. et al. Electrochemical deposition and characterization of conducting polymer polypyrrole/PSS on multichannel neural probes. **Sensors and Actuators, A: Physical**, v. 93, n. 1, p. 8–18, 2001.

DAMBORSKÝ, P.; ŠVITEL, J.; KATRLÍK, J. Optical biosensors. **Essays in Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 91–100, 2016.

DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970–979, 2004.

DE OLIVEIRA, D. P. C. et al. Biossensor eletroquímico baseado na enzima tirosinase para a determinação de fenol em efluentes. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 924–931, 2015.

DU, X.; WANG, Z. Effects of polymerization potential on the properties of electrosynthesized PEDOT films. **Electrochimica Acta**, v. 48, n. 12, p. 1713–1717, 2003.

EHSAN, M. A.; KHAN, S. A.; REHMAN, A. Screen-Printed Graphene/Carbon Electrodes on Paper Substrates as Impedance Sensors for Detection of Coronavirus in Nasopharyngeal Fluid Samples. **Diagnostics**, v. 11, n. 6, p. 1030, 2021.

FABIANI, L. et al. Magnetic beads combined with carbon black-based screen-printed electrodes for COVID-19: A reliable and miniaturized electrochemical immunosensor for SARS-CoV-2 detection in saliva. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 171, p. 112686, 2021.

FARIA, A. R. et al. Novel recombinant multiepitope proteins for the diagnosis of asymptomatic *Leishmania infantum*-infected dogs. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. 3429, 2015.

FILIZTEKIN, E.; OZKAYA, K. G. COVID-19 diagnosis — A review of current methods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 172, p. 112752, 2021.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Self-assembled monolayers applications for the development of electrochemical sensors. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381–389, 2003.

GOLDSTEIN, J. I. et al. **Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis**. 4 ed. New York: Springer, 2018.

GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400–1458, 2008.

GUAN, J. G.; MIAO, Y. Q.; ZHANG, Q. J. Impedimetric biosensors. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, n. 4, p. 219–226, 2004.

HRYNIEWICZ, B. M. et al. Influence of the pH on the electrochemical synthesis of polypyrrole nanotubes and the supercapacitive performance evaluation. **Electrochimica Acta**, v. 293, p. 447–457, 2019.

HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F. Chemical sensors definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 9, p. 1247–1250, 1991.

ITTEBOINA, R. et al. Efficient One-Pot Synthesis and pH-Dependent Tuning of Photoluminescence and Stability of $\text{Au}_{18}(\text{SC}_2\text{H}_4\text{CO}_2\text{H})_{14}$ Cluster. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 122, n. 5, p. 1228–1234, 2018.

JANÁKY, C.; VISY, C. Conducting polymer-based hybrid assemblies for electrochemical sensing : a materials science perspective. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 3489–3511, 2013.

JANEWAY, C. A. et al. The structure of a typical antibody molecule. In: **Immunobiology: The immune system in health and disease**. 5 ed. New York: Garland Science, 2001.

JANG, J.; YOON, H. Facile fabrication of polypyrrole nanotubes using reverse microemulsion polymerization. **Chemical Communications**, v. 3, n. 6, p. 720–721, 2003.

Jl, T. et al. Detection of COVID-19: A review of the current literature and future perspectives. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 166, p. 112455, 2020.

KHAN, M. Z. H. et al. Ultrasensitive detection of pathogenic viruses with electrochemical biosensor: State of the art. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 166, p. 112431, 2020.

KIM, H. E. et al. Sensitive electrochemical biosensor combined with isothermal amplification for point-of-care COVID-19 tests. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 182, p. 113168, 2021.

KRETSCHM et al. Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light. **Zeitschrift für Naturforschung A**, v. 23, n. 12, p. 2135–2136, 1968.

LANG, U. et al. Microscopical investigations of PEDOT:PSS thin films. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 8, p. 1215–1220, 2009.

LEE, D.; LEE, J. Testing on the move: South Korea's rapid response to the COVID-19 pandemic. **Transportation Research Interdisciplinary Perspectives**, v. 5, p. 100111, 2020.

LIMA, M. et al. A química dos saneantes em tempos de COVID-19: você sabe como isso funciona? **Química Nova**, v. 43, p. 668–678, 2020.

LIU, G.; RUSLING, J. F. COVID-19 Antibody Tests and Their Limitations. **ACS Sensors**, v. 6, n. 3, p. 593–612, 2021.

LOVE, J. C. et al. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 4, p. 1103–1169, 2005.

MA, Y. et al. An ultrasensitive biosensor based on three-dimensional nanoporous conducting polymer decorated with gold nanoparticles for microRNA detection. **Microchemical Journal**, v. 161, p. 105780, 2021.

MANJU, G; ASHAB, C.; MALHOTRA, B.D. Review: Application of Conducting Polymer to Biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 17, p. 345–359, 2002.

MARCHESI, L. F. et al. The electrochemical impedance spectroscopy behavior of poly(aniline) nanocomposite electrodes modified by Layer-by-Layer deposition. **Electrochimica Acta**, v. 174, p. 864–870, 2015.

MARCHESI, L. F. Q. P. **Caracterização dos processos de eletrodo em compostos do tipo LicNicCo utilizando técnicas de impedância**. 2005. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) – Universidade Federal de São Carlos, 2005.

MARUTHAMUTHU, S. et al. Conductivity and dielectric analysis of Nanocolloidal polypyrrole particles functionalized with Higher weight percentage of poly(styrene sulfonate) using the dispersion polymerization method. **Journal of Polymer Engineering**, v. 37, n. 5, p. 481–492, 2017.

MASTERS, P. S. The Molecular Biology of Coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 65, n. 6, p. 193–292, 2006.

MENDES, R. K. et al. Characterization of self-assembled thiols monolayers on gold surface by electrochemical impedance spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, p. 849–855, 2004.

MERCANTE, L. A. et al. One-pot preparation of PEDOT:PSS-reduced graphene decorated with Au nanoparticles for enzymatic electrochemical sensing of H₂O₂. **Applied Surface Science**, v. 407, n. 6, p. 162–170, 2017.

METKAR, S. K.; GIRIGOSWAMI, K. Diagnostic biosensors in medicine – A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 271–283, 2019.

MOJSOSKA, B. et al. Rapid SARS-CoV-2 detection using electrochemical immunosensor. **Sensors**, v. 21, n. 2, p. 1–11, 2021.

MOON, J. M. et al. Conducting polymer-based electrochemical biosensors for neurotransmitters: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, p. 540–552, 2018.

MORALES-NARVÁEZ, E.; DINCER, C. The impact of biosensing in a pandemic outbreak: COVID-19. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 163, p. 112274, 2020.

MUBARAKALI, D. et al. Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 360–365, 2011.

NAVEEN, M. H.; GURUDATT, N. G.; SHIM, Y. Applications of conducting polymer composites to electrochemical sensors : A review. **Applied Materials Today**, v. 9, p. 419–433, 2017.

PISANIC, N. et al. COVID-19 serology at population scale: SARS-CoV-2-specific antibody responses in saliva. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, n. 1, 2021.

POKHREL, P.; HU, C.; MAO, H. Detecting the coronavirus (COVID-19). **ACS Sensors**, v. 5, n. 8, p. 2283–2297, 2020.

PRODROMIDIS, M. I. Impedimetric immunosensors—A review. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 14, p. 4227–4233, 2010.

RASHED, M. Z. et al. Rapid detection of SARS-CoV-2 antibodies using electrochemical impedance-based detector. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 171, p. 112709, 2021.

RAVI, N. et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 detection: A comprehensive review of the FDA-EUA COVID-19 testing landscape. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 165, p. 112454, 2020.

SAHA, K. et al. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 5, p. 2739–2779, 2012.

SAM, S. et al. Semiquantitative Study of the EDC/NHS Activation of Acid Terminal Groups at Modified Porous Silicon Surfaces. **Langmuir**, v. 26, n. 2, p. 809–814, 2010.

SAMANTA, D.; SARKAR, A. Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: methods and sensor applications. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 5, p. 2567–2592, 2011.

SERRA, P. A. **Biosensors - Emerging Materials and Applications**. 1. ed. Croatia: Intech, 2011.

SINGH, P. SPR Biosensors: Historical Perspectives and Current Challenges. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 229, p. 110–130, 2016.

SMITH, C. L.; MILEA, J. S.; NGUYEN, G. H. Immobilization of Nucleic Acids Using Biotin-Strept(avidin) Systems. In: **Immobilisation of DNA on Chips II**. Berlin: Springer-Verlag, 2006.

SOARES, A. L. et al. Adsorption of catechol onto PEDOT films doped with gold nanoparticles: Electrochemical and spectroscopic studies. **Electrochimica Acta**, v. 322, p. 134773, 2019.

STEINER, D. J. et al. Array-based analysis of SARS-CoV-2, other coronaviruses, and influenza antibodies in convalescent COVID-19 patients. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 169, p. 112643, 2020.

STURMAN, L. S.; HOLMES, K. V. The Molecular Biology of Coronaviruses. In: BOZZANO LUISA (Ed.). **Advances in virus research**. Elsevier, 1983. p. 35–112.

TAMBURRI, E. et al. Growth mechanisms, morphology, and electroactivity of PEDOT layers produced by electrochemical routes in aqueous medium. **Synthetic Metals**, v. 159, n. 5–6, p. 406–414, 2009.

TEHRANI, P. et al. The effect of pH on the electrochemical over-oxidation in PEDOT:PSS films. **Solid State Ionics**, v. 177, n. 39–40, p. 3521–3527, 2007.

TORRES, M. D. T. et al. Low-cost biosensor for rapid detection of SARS-CoV-2 at the point of care. **Matter**, v. 4, n. 7, p. 2403–2416, 2021.

TRAN, V. VAN et al. Development strategies of conducting polymer-based electrochemical biosensors for virus biomarkers: Potential for rapid COVID-19 detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 182, p. 113192, 2021.

UYGUN, Z. O.; ERTUĞRUL UYGUN, H. D. A short footnote: Circuit design for faradaic impedimetric sensors and biosensors. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 202, p. 448–453, 2014.

WALLACE, G. G.; SMYTH, M.; ZHAO, H. Conducting electroactive polymer-based biosensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 245–251, 1999.

WANG, G. et al. Nanomaterial-doped conducting polymers for electrochemical sensors and biosensors. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 25, p. 4173–4190, 2018.

WELZEL, P.; KNOLL, W.; WERNER, C. Assembly modulates dissociation : electrokinetic experiments reveal peculiarities of the charge formation at monolayer films. **Chemical Communications**, p. 256–258, 2005.

WEN, Y.; XU, J. Scientific Importance of Water-Processable PEDOT-PSS and Preparation, Challenge and New Application in Sensors of Its Film Electrode: A Review. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 1121–1150, 2017.

WHO. World Health Organization: Coronavirus disease (COVID-19). Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/coronavirus>>. Acesso em: 10 out. 2021.

WILCHEK, M.; BAYER, E. A. The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. **Analytical Biochemistry**, v. 32, n. 1, p. 1–32, 1988.

WILCHEK, M.; BAYER, E. A.; LIVNAH, O. Essentials of biorecognition: The (strept)avidin–biotin system as a model for protein–protein and protein–ligand interaction. **Immunology Letters**, v. 103, n. 1, p. 27–32, 2006.

WONG, A. et al. Simultaneous determination of isoproterenol , acetaminophen , folic acid , propranolol and caffeine using a sensor platform based on carbon black ,

graphene oxide , copper nanoparticles and PEDOT : PSS. **Talanta**, v. 183, n. February, p. 329–338, 2018.

XI, H.; JUHAS, M.; ZHANG, Y. G-quadruplex based biosensor: A potential tool for SARS-CoV-2 detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 167, p. 112494, 2020.

XIA, L.; WEI, Z.; WAN, M. Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 341, n. 1, p. 1–11, 2010.

ZHAO, H. et al. Ultrasensitive supersandwich-type electrochemical sensor for SARS-CoV-2 from the infected COVID-19 patients using a smartphone. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 327, p. 128899, 2021.

ZHAO, P. et al. Immune responses against SARS-coronavirus nucleocapsid protein induced by DNA vaccine. **Virology**, v. 331, n. 1, p. 128–135, 2005.

ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 2020.

ANEXO A – DECLARAÇÕES ÉTICAS

 ERASTO GAERTNER COMBATE O Câncer com Humanaidade, Ciência e Arte	HOSPITAL ERASTO GAERTNER - LIGA PARANAENSE DE COMBATE	 Plataforma Brasil
---	--	--

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: Análise prospectiva de pacientes onco-hematológicos com COVID-19 para caracterização do perfil de citocinas plasmáticas, imunológico, cinética viral e fatores de risco, e desenvolvimento de metodologias laboratoriais para detecção de antígenos e anticorpos relacionados ao SARS-CoV2

Pesquisador: Jeanine Marie Nardin

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 31592620.4.1001.0098

Instituição Proponente: LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CANCER

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.287.113

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa.

Análise prospectiva de pacientes onco-hematológicos com COVID-19 para caracterização do perfil de citocinas plasmáticas, imunológico, cinética viral e fatores de risco, e desenvolvimento de metodologias laboratoriais para detecção de antígenos e anticorpos relacionados ao SARS-CoV2. O impacto do COVID-19 em pacientes imunocomprometidos ainda é desconhecido. Evidências acumuladas sugerem que pacientes graves com COVID-19 podem ter uma síndrome citada como "tempestade de citocinas". Compreender como pacientes com neoplasias malignas sólidas e hematológicas evoluíram frente à infecção é fundamental para determinação do procedimento clínico de suporte terapêutico e manejo de sintomas, bem como para o manejo dos recursos hospitalares. O risco de evolução desfavorável conforme o grau de imunossupressão ou a possibilidade de tais pacientes serem "poupados" da tempestade de citocinas justamente pela imunidade comprometida são pontos que precisam ser elucidados frente a evolução da doença. O estudo tem por objetivo monitorar o perfil de citocinas e imunológico, bem como a carga viral dos pacientes com neoplasias malignas sólidas e hematológicas com infecção por SARS CoV-2. Serão

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201

Bairro: Jardim das Américas

CEP: 81.520-060

UF: PR **Município:** CURITIBA

Telefone: (41)3361-5271

E-mail: cep@erastogaertner.com.br